

HERZGLYKOSIDREZEPTOREN
KONTRAHIERENDER
RATTENHERZMUSKELZELLEN
IN KULTUR

Charakterisierung hoch- und
niederaffiner Herzglykosidbindungsstellen

Bernhard Wagenknecht

*Das
München
1985*

Aus der Medizinischen Klinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern

Direktor: Professor Dr. med. G. Riecker

HERZGLYKOSIDREZEPTOREN KONTRAHIERENDER
RATTENHERZMUSKELZELLEN IN KULTUR

Charakterisierung hoch- und niederaffiner
Herzglykosidbindungsstellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bernhard Wagenknecht
aus München

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. K. Werdan

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Riecker

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	1
2 MATERIALIEN UND METHODEN	13
2.1 Materialien	13
2.2 Zusammensetzung der verwendeten Inkubations- und Spüllösungen	14
2.3 Präparation und Kultivierung von Ratten- herzzellen	15
2.4 Messung der [^3H]-g-Strophanthin-Bindung in kultivierten Rattenherzzellen	17
2.5 Messung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmeraten in kultivierten Rattenherzzellen	20
2.6 Messung der zellulären K^+ - und Na^+ -Gehalte kultivierter Rattenherzzellen	21
2.7 Untersuchungen an isolierten Zellmembranen neonataler Rattenherzen	22
2.7.1 Präparation der mit $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (EC 3.6.1.3) angereicherten Zellmembranen	22
2.7.2 Messung der [^3H]-g-Strophanthin-Bindung und der Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase-}$ Aktivität	23
2.8 Messung der Kontraktionsfrequenz, -amplitude und -geschwindigkeit kultivierter Rattenherz- muskelzellen	24

	Seite
3	31
3.1	31
3.1.1	32
3.1.2	34
3.1.3	40
3.1.3.1	42
3.1.3.2	46
3.1.3.3	50
3.1.3.4	51
3.1.4	52
3.1.4.1	52
3.1.4.2	56
3.1.5	56
3.2	60
3.2.1	60

		Seite
3.2.2	Einfluß von g-Strophanthin auf den aktiven transmembranären ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-Transport in kultivierten Rattenherzzellen	61
3.2.2.1	Wirkung von g-Strophanthin auf die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme	61
3.2.2.2	Wirkung von g-Strophanthin auf den intrazellulären Na^+ - und K^+ -Gehalt	65
3.3	Korrelation von g-Strophanthin-Bindung, Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme und intrazellulärem K^+ -Gehalt in kultivierten Rattenherzzellen	65
3.4	Beeinflussung der Pulsationsamplitude und Kontraktionsgeschwindigkeit kultivierter Rattenherzmuskelzellen durch g-Strophanthin	70
4	DISKUSSION	74
4.1	Existieren zwei unterschiedliche Herzglykosidbindungsstellen in kultivierten Rattenherzzellen?	78
4.2	Wie korreliert die Herzglykosidbindung mit biochemisch-pharmakologischen Effekten in kultivierten Rattenherzzellen?	85
4.2.1	Einfluß der g-Strophanthin-Bindung auf die Aktivität der Natriumpumpe	86
4.2.2	Einfluß von g-Strophanthin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit	87
4.3	Schlußfolgerungen	89
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	LITERATURVERZEICHNIS	98



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554813_0028

Herzglykoside gehören zu den mit am häufigsten eingesetzten Pharmaka bei der Behandlung von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und supraventrikulären Tachyarrhythmien. Bezüglich der Indikation zur Digitalistherapie herrschen jedoch kontroverse Auffassungen (10, 56, 118). Lediglich beim tachykarden Vorhofflimmern/-flattern gelten Herzglykoside in ihrer Funktion als positiv inotrope Antiarrhythmika anderen Substanzen als überlegen, während bei der akuten Herzinsuffizienz zunehmend Katecholamine und bei der chronischen Herzinsuffizienz Diuretika und Vasodilatoren sie als Mittel der ersten Wahl abzulösen scheinen (56, 58).

Seit der Einführung der herzwirksamen Glykoside in die Behandlung der "Wassersucht" durch William Withering vor 200 Jahren (195) ist sowohl ihre Pharmakodynamik als auch ihre Pharmakokinetik Gegenstand intensiver Forschungsarbeit (55). So lassen sich direkte und indirekte kardiale Wirkungen unterscheiden:

Schon früh gelang der Nachweis der direkten, positiv inotropen Wirkung am isolierten Herzmuskelpräparat (28). Dieser erwünschte positiv inotrope Effekt zeigt sich sowohl am insuffizienten als auch am nichtinsuffizienten Herzen (5, 99). Beim herzinsuffizienten Patienten führt die Steigerung der Kontraktionskraft zu einer Zunahme des Herzminutenvolumens und damit zu einer Besserung der Herzinsuffizienzsymptomatik (131). Von einer indirekten Glykosidwirkung profitieren dagegen Patienten mit Tachyarrhythmia absoluta mit oder ohne Herzinsuffizienzzeichen. Es handelt sich dabei um einen Einfluß auf den Sinus- und AV-Knoten - wie Verlängerung der Reizleitung und Zunahme der effektiven Refraktärzeit (162) - der am denervierten Herzen nach Herztransplantation ausbleibt (74, 75). Die Beobachtung läßt den Schluß zu, daß dies indirekte, vorwiegend vagal vermittelte Effekte sind, die auch zu einer Senkung der Kammerfre-

quenz bei Vorhofflimmern bzw. Vorhofflattern führen und die sich aus einer Interaktion der Glykoside mit Nervengewebe erklären (93, 152, 162).

Unabdingbare Voraussetzung für ein besseres Verständnis der Wirkungen und für die Vermeidung von Nebenwirkungen ist die genaue Kenntnis des Wirkungsmodus dieser kardioaktiven Pharmaka an der Herzmuskelzelle. Der Mechanismus der positiv inotropen Wirkung ist auf molekular-zellulärer Ebene gut untersucht.

Als gesichert kann gelten, daß die Kontraktionskraftzunahme unter herzwirksamen Steroiden, die bei einer Rezeptorbesetzung von $\leq 30\%$ auftritt (3, 54), im Endeffekt durch eine zumindest zeitweise Erhöhung der Calciumkonzentration an den kontraktiven Proteinen zustandekommen muß (8), die zu einer verstärkten Aktivierung von Troponin führt (134). Die zweite Möglichkeit, nämlich eine erhöhte Calciumempfindlichkeit der kontraktilen Proteine, ist sehr unwahrscheinlich (60). Der erhöhte intrazelluläre Calciumgehalt ist nicht nur Folge eines vermehrten Calciumeinstroms (107) oder einer Freisetzung von sarkolemmalem Calcium (126), sondern ist möglicherweise auch durch eine gehemmte oder verzögerte Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum und in die Mitochondrien der Herzmuskelzelle zu erklären (39). Dieser letzte Schritt des positiv inotropen Wirkungsmechanismus von Digitalisglykosiden ist ausführlich untersucht und gut belegt; wie es jedoch dazu kommt, darüber existieren unterschiedliche Auffassungen (140).

Nachfolgend soll nun die heute von der Mehrzahl der Wissenschaftler akzeptierte Hypothese des Wirkungsmechanismus von Digitalisglykosiden beschrieben werden (64):

1. Herzglykoside binden an eine spezifische Bindungsstelle der Zellmembran (54).

Im Jahre 1968 gelang es erstmalig, eine spezifische Bindung von radioaktiv markiertem Digoxin an isolierte Rinderherzmembranen zu zeigen (132), womit gleichzeitig der erste biochemische Nachweis von Pharmakonrezeptoren erbracht wurde. Seit dieser Zeit charakterisierten verschiedene Arbeitsgruppen diese Glykosid-Bindungsstellen (Rezeptor)-Interaktion in diversen Geweben verschiedener Spezies ausführlich (5, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 51, 54, 119, 170).

2. Die spezifische Glykosidbindung an die Bindungsstelle, die Bestandteil der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase ist (92, 173, 174, 180), hemmt den aktiven transmembranären Na^+/K^+ -Transport (6).

1953 beschrieb Schatzmann die Fähigkeit von Herzglykosiden, den aktiven transmembranären Na^+/K^+ -Transport des Erythrozyten spezifisch zu hemmen (165). Bereits vier Jahre später gelang Skou der Nachweis, daß die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase (EC 3.6.1.3) das enzymatische Korrelat dieses aktiven transmembranären Kationentransportes ist (173). Es handelt sich hierbei um ein die gesamte Zellmembran durchspannendes, ATP-spaltendes Enzymprotein, das aus zwei α -Ketten (MG je ca. 100.000 D) sowie ein oder zwei β -Ketten (MG je ca. 50.000 D) besteht und das durch intrazelluläres ATP, Mg^{2+} und Na^+ bzw. durch extrazelluläres K^+ aktiviert wird. Der transmembranäre Na^+/K^+ -Gradient wird durch den Transport von 2 Mol K^+ gegen 3 Mol Na^+ pro Mol gespaltenem ATP aufrechterhalten. Dieser elektrogene Kationenaustauschprozeß baut einen transmembranären elektrochemischen Gradienten auf, durch den seinerseits das Ruhemembranpotential der Herzmuskelzelle von etwa -80 mV entsteht (64). Die enzymatische Funktion der Hydrolyse von ATP ist an der Zellinnenseite der 100.000-D-Untereinheit und die Glykosidbindungsstelle an der Zellaußenseite lokalisiert; auch die kleinere β -Kette ist in noch nicht genau geklärter Weise in die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Reaktion einge-

bunden, da der Kationentransport durch spezifische Antikörper gegen diese Untereinheit blockiert werden kann (Übersicht bei 54, 168). 1963 wurde auch in Herzmuskelgewebe die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase nachgewiesen. Repke machte dabei die Beobachtung, daß Speziesunterschiede im Ansprechen auf definierte Digitalisdosen mit der Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber Herzglykosiden korrelieren (155, 157). Daraus und aus der Tatsache, daß Herzglykoside die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in niedriger Dosis spezifisch zu hemmen vermögen, entwickelte Repke die Hypothese, daß es sich hierbei um das Rezeptorenzym für Digitalis handelt (155, 156). Obwohl verschiedenste zelluläre Stoffwechselprozesse als primärer Angriffspunkt der Digitalisglykoside diskutiert wurden (Übersicht bei 54), konnte auch in der Folgezeit lediglich die hochspezifische und selektive Interaktion dieser Pharmaka mit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase gefunden werden (6). Die partielle Hemmung des Transportenzyms führt zu einem Anstieg der intrazellulären Natriumaktivität, wie heutzutage zuverlässig mit ionensensitiven Mikroelektroden nachweisbar ist (41, 64, 116, 117, 182) und zu einem zellulären Kaliumverlust.

3. Die permanente (109) oder transiente (5) Zunahme der intrazellulären Natriumkonzentration als Folge der gehemmten Natriumpumpe führt über das Na^+ - Ca^{2+} -Gegentransportsystem der Zellmembran zu einem vermehrten Einstrom von Ca^{2+} (161), das seinerseits die kontraktilen Proteine aktiviert (134).

Im Jahre 1968 fanden Reuter und Seitz erste Hinweise für ein Na^+ - Ca^{2+} -Transportsystem der Herzmuskelzellmembran. Sie konnten zeigen, daß der Ca^{2+} -Ausstrom aus der Zelle von dem Natriumkonzentrationsgradienten der Zellmembran abhängt (160). Dieser Na^+ - Ca^{2+} -Austausch kann bidirektional erfolgen (12) und läßt sich sowohl im intakten Herzmuskelpräparat (70), in kultivierten Herzmuskelzellen (76) als auch in Vesikeln aus Herzmembranen (153) nachweisen. Da für 1 Ca^{2+} -Ion ≥ 3 Na^+ -Ionen transportiert werden, handelt es sich um einen elektrogenen

Austauschprozeß (16, 27, 150, 154). Die Tatsache, daß der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt unter Herzglykosiden erhöht ist (107, 110, 161) spricht dafür, daß dieser Na^{+} - Ca^{2+} -Gegenaustausch eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der positiv inotropen Wirkung der Herzglykoside spielt.

Keinerlei Zweifel besteht heute darüber, daß die toxischen Glykosidwirkungen durch eine Hemmung der $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase mit daraus folgendem erhöhten Zell-Natrium und erniedrigtem Zell-Kalium verursacht sind (111, 140). Die Abnahme des Zell-Kalium führt über eine Reduktion des Ruhemembranpotentials die Zelle näher an das Schwellenpotential - es kommt zu zunehmender elektromechanischer Instabilität (111). Untersuchungen der letzten Jahre mit ionensensitiven Mikroelektroden zeigen, daß sich eine erhöhte intrazelluläre Natriumaktivität auch im Bereich positiv inotroper Glykosiddosen findet (116, 117, 182). Die Mehrzahl dieser Experimente wurde jedoch mit Purkinjefäden und nicht am Arbeitsmyokard durchgeführt. Zudem wurde auch über eine Stimulation oder über keinerlei Beeinflussung der Natriumpumpe berichtet (Übersicht bei 140). So besteht weiterhin die Frage, ob eine Hemmung des $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -Transports durch Herzglykoside nur ein Phänomen hoher Digitaliskonzentrationen ist, die zu mechanischen oder elektrophysiologischen Toxizitätszeichen führen, oder ob bereits bei niedrigen, positiv inotrop wirksamen, subtoxischen Dosen die Natriumpumpenhemmung den ersten Schritt der Reaktionskette darstellt.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über experimentelle Befunde gegeben werden, die auf einen anderen bzw. zusätzlichen Mechanismus der positiv inotropen Herzglykosidwirkung als den bisher dargestellten hinweisen:

- a) Die meisten Untersucher akzeptieren die Vorstellung einer Interaktion des Herzglykosidmoleküls von der Zellaußenseite mit der $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase als ersten Reaktionsschritt - eine intrazelluläre Wirkung schien ausgeschlossen (26, 54,

143). Isenberg führte nun Versuche mit isolierten Muskelzellen aus Rinderherz durch und konnte durch intrazellulär appliziertes g-Strophanthin, Digoxin oder Digitoxin eine Kontraktilitätszunahme der Zellen registrieren. Als Erklärungsmöglichkeit dieses - von anderen Arbeitsgruppen bisher nicht nachuntersuchten - Befundes wird die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern durch in der Zelle vorhandene Herzglykoside diskutiert (91).

- b) Trotz des wiederholt bestätigten Nachweises der Enzymhemmung in hochgereinigten ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Präparationen (168, 170) können Herzglykoside in niedrigen Konzentrationen dieses Enzym auch stimulieren (68, 69, 71, 147). Noble berichtet über elektrophysiologische Messungen, bei denen eine Kontraktionskraftzunahme im Bereich niedriger Herzglykosiddosen ohne verminderten K^+ -Gradienten und sogar bei vergrößertem K^+ -Gradienten gefunden wurde (140). Dieser - mit einer Stimulation der Na^+/K^+ -Pumpe vereinbare - Befund wird durch biochemische Versuche gestützt, die von der Arbeitsgruppe von T. Godfraind durchgeführt wurden, die ebenfalls eine Stimulierung im Bereich niedriger (10^{-9} M - 10^{-8} M) Digitaliskonzentrationen in Verbindung mit einem positiv inotropen Effekt zeigten (71, 72, 73). Die Interaktion von Herzglykosiden mit myokardialen Katecholaminen bietet eine Erklärung dieser Befunde (1, 175). In Muskelpräparaten aus dem linken Vorhof des Meerschweinchenherzens steigern niedrige g-Strophanthin-Konzentrationen (10^{-9} M) den transmembranären $^{86}\text{Rb}^+$ -Transport um ca. 25 % des Kontrollwertes - ein Effekt, der auch durch Katecholamine hervorgerufen werden kann. Nach Applikation von Betarezeptorenblockern oder nach Entleerung endogener Katecholamin-Speicher durch Reserpin ist diese Stimulation nicht mehr nachweisbar (89, 115). Kardioaktive Steroide in niedriger Dosierung können somit zu einer Zunahme des freien Katecholaminspiegels - eventuell durch Interaktion mit der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase von neuralem Gewebe

und daraus resultierender Hemmung der Katecholaminaufnahme in das Nervengewebe - führen; dies hat eine Stimulation der Natriumpumpe und einen positiv inotropen Effekt zur Folge. Höhere Digitalisdosen hemmen jedoch auf jeden Fall die Natriumpumpe (112).

- c) Neben einer Hemmung bzw. Stimulierung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase durch positiv inotrop wirksame Glykosiddosen konnten einige Studien keinerlei Einfluß auf das Enzym (137, 145) oder keine Änderung im intrazellulären Na^+ -Gehalt (15, 25) nachweisen. Bedeutung hat in diesem Zusammenhang eine von Akera vorgeschlagene Hypothese, nach der eine Natriumpumpenhemmung einen positiv inotropen Effekt ohne meßbare Zunahme des Zell-Natrium oder Abnahme des Zell-Kalium bewirken kann (5). Die Interaktion subtoxischer Digitaliskonzentrationen mit der myokardialen $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase soll die maximale Natriumtransportkapazität reduzieren, wodurch während der frühen Phase des kardialen Kontraktionszyklus das intrazelluläre Natrium vorübergehend ansteigt. Über den Na^+ - Ca^{2+} -Gegentransport (161) kommt es durch die Zunahme des subsarkolemmalen Natriums zu einem verstärkten Einstrom von Ca^{2+} und zum positiv inotropen Effekt. Die intrazelluläre Natriumzunahme erfolgt nach dieser Vorstellung zyklisch, so daß am Ende des Kontraktionszyklus aufgrund einer erhöhten Aktivität ungehemmter Natriumpumpenmoleküle der zelluläre Natriumgehalt unverändert meßbar sein könnte (7).

Eine andere Theorie stammt von der Arbeitsgruppe um H. Lüllmann. Von ihr wird die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase als Glykosidrezeptor nicht in Frage gestellt; eine Enzymhemmung konnte allerdings nur bei toxischen Konzentrationen gemessen werden. Die Kontraktionskraftzunahme unter kardioaktiven Steroiden wird durch eine Konformationsänderung von Zellmembranbestandteilen - als Folge der Interaktion eines Herzglykosidmoleküls mit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase - erklärt. Calcium, das überwiegend an Phospholipide der

Zellmembran in der Nachbarschaft der Natriumpumpe gebunden ist, könnte so labilisiert und vermehrt freigesetzt werden (125, 126).

Auch Okita fand eine Natriumpumpenhemmung lediglich durch toxische Herzglykosiddosen. Ausgehend von der Beobachtung, daß im isolierten Herzmuskelpreparat nach dem Auswaschen des Herzglykosids der Rückgang des positiv inotropen Effekts etwa um den Faktor 5 rascher erfolgte als die Dissoziation von g-Strophanthin, wurde für den positiv inotropen Effekt der kardioaktiven Steroide ein anderer - nicht näher bezeichneter - Wirkungsmechanismus, der jedoch von einer ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Hemmung unabhängig ist, postuliert (105, 144, 145).

Eine mögliche Erklärung für einige der bisher dargestellten, einander widersprechenden Befunde könnte das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Herzglykosidrezeptoren liefern. 1980 wurde an der Spezies Ratte, die als wenig herzglykosidempfindlich gilt, folgende interessante Beobachtung gemacht:

Am isolierten Ventrikelstreifen ließ sich bereits bei einer sehr niedrigen Strophanthinkonzentration eine Kontraktionskraftzunahme nachweisen ($\text{EC}_{50} = 3 \times 10^{-7} \text{ M}$) während es erst bei um zwei Zehnerpotenzen höheren Konzentrationen ($> 3 \times 10^{-5} \text{ M}$) zum Auftreten von toxischen Effekten (Arrhythmien) kam. Dieses - ganz im Gegensatz zu der geringen therapeutischen Breite der Herzglykoside stehende - Ergebnis fand eine einfache Erklärung. Das Rattenherz besitzt nicht nur eine, sondern zwei Klassen von Herzglykosidrezeptoren. Die Besetzung der hochaffinen Rezeptoren führt lediglich zur positiv inotropen, jedoch nicht zur toxischen Wirkung. Letztere tritt nur bei Besetzung der niederaffinen Rezeptoren auf und ist mit einer höhergradigen Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase gekoppelt (52).

Das Vorhandensein zweier funktionell unterschiedlicher Herzglykosidrezeptoren im Rattenherz besitzt besonderes pharmakologi-

sches Interesse und klinische Relevanz. Ein Kardinalproblem bei der Behandlung mit Herzglykosiden ist nämlich deren geringe therapeutische Breite (22). Vom klinischen Aspekt läßt sich dieser Begriff definieren als der Abstand der Dosen, die einen minimalen bzw. maximalen positiv inotropen Effekt bewirken (100). Die hohe Intoxikationsrate von 10 % - 20 % langzeitbehandelter Patienten (22) ist vor diesem Hintergrund zu sehen. Zwar ist es heutzutage möglich, Serumdigoxinspiegel zu bestimmen, jedoch korreliert die Serumkonzentration nur in geringem Umfang mit der Häufigkeit von Nebenwirkungen und spiegelt auch nicht die aktive Konzentration am Rezeptor - dem eigentlichen Wirkort - wieder (9). Hinzu kommt, daß verschiedene pathophysiologische Zustände - wie Hypokaliämie (50) oder Hypercalcämie (142) - ein verändertes Ansprechen auf Herzglykoside bewirken können. Auch Versuche, neue cardioaktive Steroide mit dem Ziel einer positiv inotropen Wirkung in einem breiteren Konzentrationsbereich und geringerer Nebenwirkungen zu synthetisieren, brachten kaum Fortschritte (85). Falls es nun gelänge, auch im menschlichen Myokard unterschiedliche Rezeptoren für Herzglykoside zu finden, von denen einer für den therapeutisch erwünschten positiv inotropen Effekt und der andere für toxische Effekte (Arrhythmien) verantwortlich ist, würde dies bedeuten, daß Wirkungen und Nebenwirkungen nicht unweigerlich miteinander gekoppelt sind. Es wäre damit die zelluläre Voraussetzung dafür gegeben, Substanzen zu suchen bzw. zu synthetisieren, die selektiv mit einer der Bindungsstellen interagieren können.

Der Nachweis zweier unterschiedlicher Klassen von Herzglykosidrezeptoren im Rattenherz basiert auf Untersuchungen an Zellmembranhomogenaten und isolierten Herzmuskelpräparaten (52). Beide Untersuchungsobjekte haben jedoch Nachteile, welche die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken. Da bei Membranhomogenaten die Zellintegrität aufgehoben ist, und da isolierte Zellmembranen keine Kationenkonzentrationsgradienten mehr trennen, läßt sich die Herzglykosidbindung lediglich mit der Enzymaktivität, nicht jedoch mit dem aktiven Na^+/K^+ -Transport - der eigentlich

physiologischen Funktion - korrelieren (6). Überdies besteht Myokardgewebe - das Ausgangsmaterial der Membranpräparation - nicht nur aus Herzmuskel-, sondern auch aus Bindegewebszellen (Endothel-, Epithelzellen, Fibroblasten; 167). Diese Inhomogenität des Herzgewebes kann die Interpretation von Bindungsstudien erschweren. Isolierte Herzmuskelpräparate als weiteres etabliertes experimentelles Modell bieten zwar die Möglichkeit, Bindung, Kationentransport und Kontraktionskraft zu messen und zu korrelieren; eine Beurteilung der Resultate ist jedoch problematisch, da, neben der auch hier vorhandenen Heterogenität des Gewebes, immer auch mit indirekten Glykosidwirkungen z. B. auf Nervengewebe zu rechnen ist (175), und der beträchtliche Interzellulärraum von 20 % - 34 % (113) eine quantitative Analyse erschwert.

Als alternatives Untersuchungsobjekt bieten sich kontrahierende kultivierte Herzmuskelzellen an. Experimente mit kultivierten, als Monolayer gewachsenen Herzmuskelzellen haben gegenüber Enzympräparationen den Vorteil, alle Schritte der Herzglykosid-Rezeptor-Interaktion untersuchen und quantitativ korrelieren zu können (188, 197). Da die Herzglykosidbindungsstelle an der Außenseite der Zellmembran liegt (54), ist sie für [^3H]-g-Strophanthin leicht zugänglich; eine Charakterisierung der Herzglykosidbindung ist dadurch möglich (133, 188). Ferner lassen sich die Auswirkungen der g-Strophanthin-Bindungsstellen-Interaktion auf den aktiven transmembranären Na^+/K^+ -Transport (17, 133, 188), sowie die Pulsationsamplitude und Kontraktionsgeschwindigkeit (94, 164) analysieren. Die Nachteile isolierter Muskelpräparate, wie z. B. der große Interzellulärraum und lange Diffusionsstrecken (113), Einflüsse von Neurotransmittern und nervalem Gewebe (175, 181) und zelluläre Heterogenität des Untersuchungsmaterials (167) sind nicht vorhanden. In kultivierten Herzzellen sind neurale Strukturen nicht mehr intakt (37), der Interzellulärraum ist klein (ca. 5 %; 14) und Herzmuskelzellen und Herzbindegewebszellen (Endothel-, Epithelzellen, Fibroblasten) können getrennt gezüchtet und untersucht werden (18).

Diese Vorteile des Arbeitens mit kultivierten Herzzellen sind ein Grund für die zahlreichen biochemischen und pharmakologischen Experimente an diesem Modell (Übersicht bei 80, 164). Auch die Wirkung der Herzglykoside wurde an Herzmuskelzellkulturen verschiedener Spezies eingehend untersucht (2, 17, 67, 84, 96, 97, 98, 102, 133, 138, 143, 146, 187, 188, 196). Besonders an Muskelzellen aus den Herzen embryonaler Hühner konnte durch Bindungsexperimente der Herzglykosidrezeptor charakterisiert werden (17, 96, 97, 98, 187, 188). Es gelang weiterhin sowohl der Nachweis einer herzglykosidinduzierten Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes (17, 96, 187, 188) als auch einer damit verbundenen Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Transportsystems (17). Überdies ist die positiv inotrope bzw. toxische Glykosidwirkung an diesen Zellen quantitativ erfaßbar (17, 102). Herzglykoside wirken somit an Herzmuskelzellkulturen in gleicher Weise wie am intakten Herzen positiv inotrop (64). Dieses Untersuchungsobjekt ist infolgedessen zum Studium des direkten kardialen Wirkungsmechanismus der herzwirksamen Steroide geeignet.

Da sich auch die Herzmuskelzellen neonataler Ratten gut kultivieren lassen (82, 185, 186), kann die mögliche Existenz unterschiedlicher Klassen von Herzglykosidrezeptoren des Rattenherzens (52) mit Zellkulturmethoden an der intakten Herzmuskelzelle eindeutig nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es in der kultivierten intakten Rattenherzmuskelzelle tatsächlich zwei unterschiedliche Klassen von Herzglykosidbindungsstellen, wie dies für Membranpräparationen des Rattenherzens gilt, oder handelt es sich dabei vielmehr um Bindungsstellen auf unterschiedlichen myokardialen Zellpopulationen (Herzmuskelzellen und Herzbindegewebszellen)?

2. Falls die Rattenherzmuskelzelle zwei Bindungsstellen besitzt, welche davon vermittelt dann die positiv inotrope Wirkung bzw. - als Folge der Hemmung der Natriumpumpe - den toxischen Effekt?
3. Läßt sich auch in der intakten kultivierten Rattenherzmuskelzelle die klinisch-pharmakologisch relevante Beobachtung machen, daß therapeutisch erwünschte Wirkungen (positive Inotropie) und Nebenwirkungen (Arrhythmien) aufgrund der Existenz zweier funktionell unterschiedlicher Herzglykosidrezeptoren nicht unweigerlich miteinander verknüpft sind?

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

Die verwendeten Chemikalien und radioaktiv markierten Verbindungen wurden von nachstehenden Firmen bezogen:

- Amersham-Buchler, D-3300 Braunschweig: Inulin-[^{14}C]-Carboxylsäure, 2,02 $\mu\text{Ci/mg}$.
- Biochrom, D-1000 Berlin: Collagenase "Worthington", 125 - 250 U/mg, CLS II; fötales Kälberserum, Nr. S 0103; Pferdeserum, Nr. S 0133; CMRL-1415-ATM-Medium.
- Byk-Essex, D-8000 München: Gentamycin (Sulmycin[®]).
- NEN Chemicals, D-6072 Dreieich: $^{22}\text{NaCl}$, trägerfrei; $^{86}\text{RbCl}$, 0,9 - 4,6 mCi/mg; [^3H]-g-Strophanthin, 14 - 20 Ci/mmol.
- Serva Biochemica, D-6900 Heidelberg: Trypsin 1 : 250, Nr. 37 290; Rinderalbumin, Nr. 11 920; Hepes, Nr. 25 245; Sorbit, Nr. 35 230.

Alle anderen verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen erstanden:

- Boehringer-Mannheim, D-6800 Mannheim;
- Merck, D-6100 Darmstadt;
- Serva Biochemica, D-6900 Heidelberg.

2.2 ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN INKUBATIONS- UND SPÜLLÖSUNGEN

a) Wachstums-(Züchtungs-)Medium:

CMRL-1415-ATM-Medium gemäß (86), ergänzt durch 10 % Pferdeserum, 10 % fötales Kälberserum und 0,05 mg/ml Gentamycin, pH = 7,40 (eingestellt mit NaOH). Das Wachstumsmedium für Bindegewebszellen enthält kein Pferdeserum.

b) Standard-Inkubationsmedium:

CMRL-1415-ATM-Medium gemäß (86), ergänzt durch 2,5 % Pferdeserum und 2,5 % fötales Kälberserum, gepuffert mit 20 mM Hepes, pH = 7,40 (eingestellt mit NaOH), K^+ -Konzentration = 0,75 mM (wenn nicht anders angegeben).

c) Wasch-(Spül-)Lösung:

135 mM NaCl; 0,75 mM KCl; 1,8 mM $CaCl_2$; 1,05 mM $MgCl_2$; 0,36 mM NaH_2PO_4 ; 5 mM D-Glukose; 5 mM Hepes; pH = 7,40 (eingestellt mit NaOH).

d) Calcium-Sorbitol-Lösung:

1,8 mM $CaCl_2$; 280 mM Sorbit; pH = 7,40 (eingestellt mit NaOH).

e) PBSAG:

Phosphate-Buffered-Saline A + Glukose; PBSAG stellt eine von Harary et al. (82) beschriebene Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Salzlösung mit folgender Zusammensetzung dar: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,6 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$; 2,1 mM KH_2PO_4 ; pH = 7,40. Da noch D-Glukose (Endkonzentration 5 mM) zugegeben wurde, wird die Bezeichnung PBSAG verwendet.

f) Zell-Detergenz:

0,1 M NaOH; 4,5 mM EDTA.

2.3 PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG VON RATTENHERZZELLEN

Neben Muskelzellen enthält das Herz neonataler Ratten zu etwa 20 % - 40 % auch Zellen ohne Sarkomere (167), die eine hohe Proliferationskapazität besitzen und die im englischen Schrifttum als "non muscle cells" oder "fibroblastoid cells" bezeichnet werden. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Fibroblasten und Endothelzellen (18, 130). In der vorliegenden Arbeit wird für diese Zellart der Begriff "Bindegewebszellen" verwendet.

Die nachfolgend an der intakten Zelle beschriebenen Experimente wurden in der Regel sowohl an Muskelzellen als auch an Bindegewebszellen aus den Herzen neonataler Ratten durchgeführt.

Die Präparation der Rattenherzzellen erfolgte weitgehend nach der von Harary et al. (82) beschriebenen Methode (14, 185, 186, 190, 192, 193):

Unter sterilen Bedingungen (Laminar Flow) wurden 50 - 200 neonatale Wistar-Ratten (0 - 5 Tage alt) dekapitiert. Die aus dem eröffneten Thoraxraum präparierten, noch schlagenden Herzen wurden, ohne die Ventrikel von den Vorhöfen zu trennen, in eiskalter (4 °C) PBSAG-Lösung (s. 2.2) gesammelt und anschließend in kleinste Stücke (Kantenlänge 1 mm) geschnitten. Die Herauslösung der Zellen aus dem Zellverband erfolgte durch fraktionierte enzymatische Behandlung (Zugabe eines 0,12 % Trypsin-0,03%-Collagenase-Gemisches in PBSAG gelöst, Einwirkdauer jeweils 15 Minuten, Temperatur 37 °C). Wegen des relativ hohen Anteils an Zellfragmenten, Erythrozyten und Bindegewebszellen (14) wurden die aus den ersten drei Behandlungen gewonnenen Zellsuspensionen verworfen. Alle nachfolgenden Zellsuspensio-

nen (jeweils etwa 15 - 20 ml) gab man zusammen mit 1 ml eiskaltem (4 °C) Wachstumsmedium (s. 2.2) in Zentrifugenröhrchen (der Serumanteil des Wachstumsmediums hebt die enzymatische Trypsinwirkung auf), zentrifugierte die Zellen ab (für 10 Minuten bei 300 x g), verwarf die Überstände und suspendierte die sedimentierten Herzzellen mit frischem Wachstumsmedium (37 °C).

Die so erhaltene heterogene Zellsuspension wurde auf mehrere 175 cm² große Plastikkulturflaschen (Nunclon Plastiks, Roskilde, Dänemark) verteilt und für etwa zwei Stunden in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 37 °C inkubiert (Heinicke-Napco-Brutschrank).

Dieses von Blondel und Mitarbeitern (18) beschriebene Verfahren der sogenannten "Differential Attachment Technique" (DAT) beruht auf einer unterschiedlichen Absetzgeschwindigkeit von suspendierten Muskel- und Bindegewebszellen. Mit ihm gelingt eine Trennung der beiden Zellarten, indem sich der größte Teil der Bindegewebszellen auf dem Boden der Kulturfläschchen absetzt, während die Muskelzellen in Suspension bleiben und in einem Becherglas gesammelt werden können. Nach Messung der Zellkonzentration in einem Hämocytometer unter dem Phasenkontrastmikroskop und Verdünnung mit Wachstumsmedium (s. 2.2) auf die gewünschte Zelldichte wurde die Herzmuskelzellsuspension auf 25 cm² Plastikkulturfläschchen (Nunclon Plastiks, Roskilde, Dänemark) verteilt (Einsaatdichte etwa 10⁵/cm²; 5 ml Zellsuspension/Fläschchen).

Die Züchtung der Zellen erfolgte bei 37 °C in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre (Heinicke-Napco-Brutschrank). Aufgrund der hohen Pufferkapazität des Wachstumsmediums CMRL-1415-ATM konnte auf eine zusätzliche Begasung mit 5 % CO₂ verzichtet werden (86). Bei Züchtung der Herzmuskelzellen in offenen Systemen (Petrischälchen) wurde das Wachstumsmedium zusätzlich mit 20 mM Hepes gepuffert.

Nach 12 bis 24 Stunden gewannen die Muskelzellen Bodenkontakt und begannen mit rhythmischen Kontraktionen; nach zwei bis drei Tagen - zu diesem Zeitpunkt wurden die Experimente durchgeführt - hatte sich ein synchron schlagender Zellrasen mit mindestens ca. 75 % kontrahierenden Herzmuskelzellen gebildet (14).

Die bei der Präparation der Rattenherzmuskelzellen nach der "DAT-Zeit" anfallenden Rattenherzbindegewebszellen wurden in Wachstumsmedium ohne Pferdeserum (s. 2.2) weitergezüchtet.

Nachdem sich ein lückenloser Rasen von Bindegewebszellen gebildet hatte, wurden die Zellen zur Subkultivierung zweimal mit PBSAG gespült und nachfolgend etwa 15 Minuten in 0,1 mM EDTA + 0,05 % Trypsin (in PBSAG gelöst) bei 37 °C inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurden sie abzentrifugiert und das Sediment in frischem Wachstumsmedium (ohne Pferdeserum) aufgeschwemmt. Die verdünnte Zellsuspension (Verdünnung im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 3) wurde auf Kulturfläschchen verteilt und die Bindegewebszellen wurden in gleicher Weise wie Herzmuskelzellen weitergezüchtet.

Nach zwei bis drei Tagen hatte sich ein konfluenter Zellrasen gebildet - zu diesem Zeitpunkt wurden die Experimente durchgeführt.

2.4 MESSUNG DER [³H]-g-STROPHANTHIN-BINDUNG IN KULTIVierten RATTENHERZZELLEN

Alle Messungen wurden - soweit nicht anders angegeben - mit Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) bei 37 °C mit Herzzellen (Muskel- und Bindegewebszellen) in 25 cm² Plastikkulturfläschchen durchgeführt.

Nach Absaugen des Wachstumsmediums (s. 2.2) wurden die Zellkulturen zweimal mit je 5 ml Waschlösung (37 °C; s. 2.2) und einmal mit 4 ml Standard-Inkubationsmedium (37 °C; s. 2.2) gespült und anschließend in 4 ml [³H]-g-Strophanthin-haltigem Inkubationsmedium (ca. 3×10^6 cpm [³H]-g-Strophanthin/Fläschchen) inkubiert.

Bezüglich der Inkubationsdauer und Zusammensetzung des Inkubationsmediums (K^+ -Gehalt, g-Strophanthin-Konzentration) sei auf die Legenden der Abbildungen und Tabellen verwiesen.

Bei Dissoziationsexperimenten wurden die Zellen nach einer vierstündigen Inkubationszeit in [³H]-g-Strophanthin-haltigem Inkubationsmedium (Äquilibriumbedingungen; s. 3.1.1) fünfmal mit 5 ml Standard-Inkubationsmedium (37 °C; s. 2.2) gewaschen und anschließend in 4 ml strophanthinfreiem Standard-Inkubationsmedium weiterinkubiert.

Nach Beendigung der Inkubationsphase wurde das jeweilige Inkubationsmedium abgesaugt, der Zellrasen fünfmal mit je 5 ml eiskalter (4 °C) Calcium-Sorbitol-Lösung (s. 2.2) gespült und anschließend in 1,3 ml Zell-Detergenz (s. 2.2) aufgelöst.

Zur Radioaktivitätsmessung wurden 700 µl davon in ein Szintillationsröhrchen (Fa. Zinsser, D-6000 Frankfurt) pipettiert, mit 70 µl einer 1 M HCl neutralisiert und in 10 ml Unisolve (Fa. Zinsser) aufgeschwemmt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Fa. Berthold-Frieske, D-8000 München). 2 x 50 µl wurden für die Proteinbestimmung nach Lowry (124) mit Rinderalbumin als Standard verwendet. Mit 2 x 200 µl wurde die flammenphotometrische Bestimmung der zellulären K^+ -Gehalte (s. 2.6) durchgeführt.

Zur Ermittlung der spezifisch (an den Herzglykosidrezeptor) gebundenen g-Strophanthinmenge wurde der in jedem Experiment neu bestimmte Anteil der unspezifischen Bindung (z. B. Adhäsionen

an Bestandteile der Zellmembran) von der Gesamtbindung subtrahiert.

Die Kriterien der unspezifischen Bindung an Zellmembranpräparationen (54) sind auf kultivierte Herzmuskelzellen übertragbar (188, 197). So läßt sich die spezifische [^3H]-g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung an kultivierte Rattenherzzellen sowohl durch Inkubation in Gegenwart hoher g-Strophanthinkonzentrationen (10^{-2} M - 10^{-4} M) oder hoher K^+ -Konzentrationen (20 mM K^+ ; s. 3.1.4) oder durch Hitzedenaturierung (s. 3.1.5) beseitigen. Die unspezifische Bindung ist in allen drei Fällen vergleichbar hoch. Sie beträgt, bei 6×10^{-8} M g-Strophanthin im Inkubationsmedium, für Rattenherzmuskelzellen (29 ± 2) % [MW $\pm$ SEM; n = 20] und für Rattenherzbindegewebszellen (57 ± 5) % [MW $\pm$ SEM; n = 5] der gebundenen Gesamtradioaktivität.

Der auf diese Weise erhaltene Wert für die spezifische Bindung nach vierstündiger Inkubation in Standard-Inkubationsmedium in Gegenwart von 6×10^{-8} M [^3H]-g-Strophanthin von (186 ± 21) fmol/mg Prot. [MW $\pm$ SEM; n = 17] für Rattenherzmuskelzellen und von (26 ± 6) fmol/mg Prot. [MW $\pm$ SEM; n = 5] für Rattenherzbindegewebszellen steht in guter Übereinstimmung mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen (135, 169).

Um die Anzahl der g-Strophanthin-Bindungsstellen pro Herzmuskelzelle ermitteln zu können, wurde die spezifische Bindung - gemessen in fmol/mg Protein - zu dem Verhältnis von Zellzahl/Zellprotein in Beziehung gesetzt.

Der Wert der Zellzahl ergab sich durch Auszählung der Zellen in der Zählkammer unter dem umgekehrten Phasenkontrastmikroskop (Leitz Diavert), nachdem der Zellrasen durch 0,1 mM EDTA + 0,05 % Trypsin (in PBSAG gelöst) vom Fläschchenboden abgelöst worden war. Anschließend konnte man die Zellzahl auf die Gesamtfläche des Kulturfläschchens umrechnen und mit dem Proteingehalt des Fläschchens (ermittelt nach Lowry; 124) korrelieren.

Für das Verhältnis Zellzahl/Zellprotein ergab sich für Rattenherzmuskelzellen ein Wert von $(1,5 \pm 0,2) \times 10^6$ Zellen/mg Protein [MW $\pm$ SEM; n = 6] und für Rattenherzbindegewebszellen ein Wert von $(2,3 \pm 0,3) \times 10^6$ Zellen/mg Protein [MW $\pm$ SEM; n = 7].

2.5 MESSUNG DER ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-AUFNAHMERATEN IN KULTIVIERTEN RATTENHERZZELLEN

Zur Messung des aktiven transmembranären Kaliumtransportes in kultivierten Rattenherzzellen, der ein Maß für die Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ ist, kann statt $^{42}\text{K}^+$ das Isotop $^{86}\text{Rb}^+$ verwendet werden, da beide Kationen mit vergleichbaren Transportraten in die Zelle aufgenommen werden und ^{86}Rb aufgrund seiner längeren Halbwertszeit von 18,7 Tagen gegenüber $^{42}\text{K}^+$ ($T_{1/2} = 12,5$ Stunden) meßtechnische Vorteile bietet (14, 185, 186). Die Aufnahme sowohl von $^{42}\text{K}^+$ als auch von $^{86}\text{Rb}^+$ in kultivierte Rattenherzzellen ist über einen Zeitraum von mindestens 15 Minuten linear (186). Daher wurde, soweit nicht anders angegeben, bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Experimenten, nach einer Einstromzeit von 10 Minuten das zellgebundene $^{86}\text{Rb}^+$ bestimmt und als nmol $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)\text{-Aufnahme}$ pro mg Protein und Minute angegeben. Diese Einheit errechnet sich unter Berücksichtigung der jeweiligen extrazellulären K^+ -Konzentration und erlaubt, gegenüber dem reinen Meßwert in cpm $^{86}\text{Rb}^+$ pro mg Protein, einen besseren Vergleich von unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen erhobenen Ergebnissen (185).

Zur Messung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)\text{-Aufnahmerate}$ wurde der Zellrasen, nach Absaugen des Wachstumsmediums (s. 2.2), zweimal mit je 5 ml Waschlösung (37 °C; s. 2.2) und einmal mit 4 ml Standard-Inkubationsmedium (37 °C; s. 2.2) gespült und anschließend mit 4 ml Standard-Inkubationsmedium in Gegenwart verschiedener g-Strophanthin-Konzentrationen für vier Stunden inkubiert. Danach wurden 50 μl $^{86}\text{RbCl}$ pro Kulturfläschchen für 10 Minuten bzw. 0,25 Minuten zugegeben. Nach Beendigung dieser Inkuba-

tionsphase wurde das radioaktive Medium abgesaugt, der Zellrasen fünfmal mit je 5 ml eiskalter (4 °C) Calcium-Sorbitol-Lösung (s. 2.2) gespült, in 1,3 ml Zell-Detergenz (s. 2.2) aufgelöst und identisch wie in 2.4 beschrieben aufbereitet (Proteinbestimmung, Radioaktivitätsmessung und flammenphotometrische Bestimmung des K^+ -Gehaltes).

Aus der Differenz der intrazellulären $^{86}Rb^+$ -Aktivität zum Zeitpunkt $t = 10$ Minuten und $t = 0,25$ Minuten, dividiert durch die Zeit (9,75 min), läßt sich die Aufnahme rate von $^{86}Rb^+$ pro Minute errechnen. Bei Kenntnis des Proteingehalts pro Kulturfläschchen und der spezifischen Radioaktivität können auf diese Weise die Influxraten von ($^{86}Rb^+ + K^+$) in nmol/mg Protein x min bestimmt werden.

2.6 MESSUNG DER ZELLULÄREN K^+ - UND Na^+ -GEHALTE KULTIVierter RATTENHERZZELLEN

a) K^+ -Gehalte

Am Ende eines jeden Experiments wurde der Zellrasen durch 1,3 ml Zell-Detergenz (s. 2.2) aufgelöst. 2 x 200 µl dieser Zellsuspension wurden zur Bestimmung des zellulären K^+ -Gehaltes verwendet, indem je 200 µl in ein Szintillationsröhrchen (Fa. Zinsser) pipettiert und mit bidestilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt wurden. Flammenphotometrisch (Eppendorf-Flammenphotometer) konnte der K^+ -Gehalt dieser Flüssigkeit bestimmt werden; unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnungsfaktoren und des Proteingehalts pro Kulturfläschchen läßt sich daraus der zelluläre K^+ -Gehalt in nmol/mg Zellprotein berechnen.

b) Na^+ -Gehalte

Der zelluläre Gehalt an austauschbarem Natrium läßt sich mittels $^{22}Na^+$ bestimmen (186):

Dazu wurden Rattenherzzellen (25-cm²-Plastikkulturfläschchen) - wie in 2.4 beschrieben - mit Waschlösung und Standard-Inkubationsmedium gespült und anschließend in 4 ml Standard-Inkubationsmedium (mit bzw. ohne g-Strophanthin) mit ²²NaCl (ca. 8 x 10⁶ cpm ²²Na⁺/Fläschchen) für vier Stunden inkubiert. Dieser Zeitraum reichte zur Einstellung eines Gleichgewichts des transmembranären Ein- und Ausstroms von ²²Na⁺ aus (186). Danach wurde das Inkubationsmedium abgesaugt, der Zellrasen fünfmal mit 5 ml Calcium-Sorbitol-Lösung (4 °C; s. 2.2) gespült, in 1,3 ml Zell-Detergenz (s. 2.2) aufgelöst und - wie in 2.4 beschrieben - weiter aufgearbeitet.

Aus der zellgebundenen Radioaktivität, die ein Maß für die unter Gleichgewichtsbedingungen im Zellinneren vorhandene Menge an Natrium ist, kann über die spezifische Radioaktivität der intrazelluläre Na⁺-Gehalt in nmol/mg Protein errechnet werden.

2.7 UNTERSUCHUNGEN AN ISOLIERTEN ZELLMEMBRANEN NEONATALER RATTENHERZEN

Die an Herzzellen gewonnenen Ergebnisse wurden mit denen verglichen, die mit (Na⁺ + K⁺)-ATPase-angereicherten Herzmuskelzellmembranen aus den Herzen neonataler Ratten - dem gleichen Ausgangsmaterial wie für die Gewinnung von Herzzellen - erhalten wurden.

2.7.1 Präparation der mit (Na⁺ + K⁺)-ATPase (EC 3.6.1.3) angereicherten Zellmembranen

Nach Dekapitation wurden die Herzen von 200 neonatalen Ratten (ein bis drei Tage alt, 6,6 g Feuchtgewicht) rasch entnommen und in 60 ml Saccharose-EDTA-Lösung (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, Imidazol ad pH 7,25) homogenisiert. Das Homogenat wurde unter Rühren mit 5 ml Natriumdesoxicholat-Lösung (5 %) ver-

setzt, 20 Minuten lang unter Eiskühlung bei 0 °C gerührt und anschließend 30 Minuten lang bei 25.000 Upm (Beckmann L5-50, Ti 35 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer 1-mM-EDTA-Lösung (pH 7,25) im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und anschließend 45 Minuten lang bei 44.000 Upm (Ti 60 Rotor) zentrifugiert. Das Sediment suspendierte man nun in 18 ml einer 1-mM-EDTA-Lösung (pH 7,25) und fror es bei -20 °C ein. Vor dem Experiment wurde die Suspension bei Zimmertemperatur aufgetaut und homogenisiert.

Die Messung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität erfolgte mit dem gekoppelten optisch-enzymatischen Test nach Schoner et al. (166). Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität der Rattenherzzellmembranen betrug bei 37 °C etwa 0,12 $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ Protein. Etwa 63 % dieser Aktivität waren durch 10^{-3} M g-Strophanthin hemmbar. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (124) mit Rinderalbumin als Standard.

2.7.2 Messung der $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin-Bindung und der Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität

Zur Messung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität unter g-Strophanthin-Einfluß wurden Rattenherzzellmembranen bei 37 °C mit 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 50 mM Imidazol/ HCl (pH 7,25), 5 nM $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen (10^{-8} M - 10^{-3} M) von g-Strophanthin inkubiert (2,0 ml Gesamtvolumen). Nach dem Erreichen eines Gleichgewichts der g-Strophanthin-Bindung an die Enzymmoleküle nach 60 Minuten (Experimente nicht gezeigt) wurden 0,8 ml der Enzymsuspension zur Bestimmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität mit dem gekoppelten optisch-enzymatischen Test entnommen (166). Dabei wurde die Reaktion mit Hilfe eines Extinktionschreibers (Eppendorf-Kompensations-schreiber 6511) bei 334 nm kontinuierlich beobachtet. Die Gesamt-ATPase-Aktivität erhielt man durch Zugabe einer entsprechenden Menge H_2O anstelle von g-Strophanthin und anschließen-

der Messung der Aktivität im gekoppelten optisch-enzymatischen Test. Die unspezifische ATPase-Aktivität, d. h. der durch 10^{-3} M g-Strophanthin nicht hemmbare Anteil der Gesamtaktivität, wurde zur Ermittlung der spezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität von der Gesamtaktivität subtrahiert.

Die verbliebenen 1,2 ml Enzymsuspension dienten zur Bestimmung der [^3H]-g-Strophanthin-Bindung mit Hilfe der "Schnellen Filtrationsmethode", wie von Erdmann et al. (52) beschrieben. Die unspezifische Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M g-Strophanthin wurde zur Ermittlung der spezifischen Bindung jeweils von der gesamten gemessenen Bindung subtrahiert.

2.8 MESSUNG DER KONTRAKTIONSFREQUENZ, -AMPLITUDE UND -GESCHWINDIGKEIT KULTIVierter RATTENHERZMUSKELZELLEN

Zur Analyse des Kontraktionsverhaltens kultivierter Rattenherzmuskelzellen eignet sich die Registrierung der Kontraktionsfrequenz, der Pulsationsamplitude (x) und der Kontraktionsgeschwindigkeit (dx/dt) (14, 185). Diese drei Meßparameter wurden mit einer elektrooptischen Meßanordnung (s. Abb. 1), die in Anlehnung an ein von Kaumann et al. (95) beschriebenes System entwickelt wurde, aufgezeichnet (14):

Ein umgekehrtes Phasenkontrastmikroskop (Leitz Diavert) vergrößert (300fach) das Bild einer kontrahierenden Herzmuskelzelle, das dann mittels einer auf das Mikroskop aufgesetzten Fernsehkamera (Grundig FA 70 B) auf einem Monitor (Grundig BG 23 T) sichtbar gemacht wird. Gleichzeitig kann der Kontraktionsablauf mit einem Videorecorder (Grundig BK 3000 Color) auf Videoband gespeichert und somit auch zu einem späteren Zeitpunkt weiter ausgewertet werden. Um eine konstante Außentemperatur während der gesamten Registrierzeit aufrecht erhalten zu können, sind das Phasenkontrastmikroskop und die Fernsehkamera in ein Inkubationsgehäuse eingebaut, dessen Innentemperatur durch einen

ELEKTROOPTISCHES SYSTEM ZUR REGISTRIERUNG VON KONTRAKTIONEN KULTIVierter HERZMUSKELZELLEN

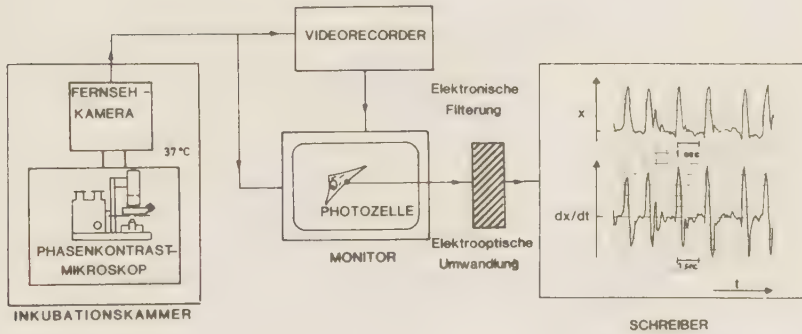


Abb. 1: Schema

Elektrooptisches System zur Registrierung von Kontraktionsfrequenz, -amplitude und -geschwindigkeit in kultivierten Herzmuskelzellen.

Eine ausführliche Beschreibung und ergänzende Erläuterungen finden sich in Abschnitt 2.8.

Thermostaten geregelt werden kann (Registrierung üblicherweise bei 37 °C).

Der Kontrast zwischen dem dunklen Zell-Leib und dem hellen Bildschirmhintergrund wird zur Registrierung des Kontraktionsablaufs benutzt: Kontraktionen einer schlagenden Herzmuskelzelle führen zu einer periodischen Zu- und Abnahme der Lichtintensität im Bereich des Zellrandes. Diese rhythmischen Lichtintensitätsänderungen werden durch eine Photozelle (BPY 61, Fa. Siemens), die auf dem Monitor über dem Zellrand befestigt ist, registriert, von einem Photomultiplier in elektrische Impulse umgewandelt und elektronisch gefiltert. Schließlich kann das "Lichtsignal" als Spannungsänderung mittels eines Schreibers (Hellige Mehrkanalschreiber) aufgezeichnet werden. Neben der Messung von Kontraktionsfrequenz und Pulsationsamplitude x erlaubt ein differenzierender Vorverstärker die Registrierung der Kontraktionsgeschwindigkeit dx/dt (s. Abb. 1).

Zur Analyse des Einflusses von g-Strophanthin auf die oben angeführten Kontraktionsparameter wurden Rattenherzmuskelzellen auf runden Glasdeckgläschen (32 mm Durchmesser) in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) zwei bis vier Tage lang gezüchtet. Die Deckgläschen wurden danach für den Versuch in die in Abb. 2 dargestellte Inkubationskammer aus Plexiglas (Fa. J. Weiss, D-8000 München) eingelegt. Diese Inkubationskammer besteht aus einer "Grundplatte" (70 mm x 41 mm x 6 mm) und einer "Deckplatte" (70 mm x 41 mm x 3 mm), in der jeweils eine kreisförmige Fläche (26 mm Durchmesser) ausgestanzt ist. Auf das mit Herzmuskelzellen bewachsene Deckgläschen wurden zwei Silikongummiringe (32 mm Außendurchmesser; 26 mm Innendurchmesser; Fa. Menzel, D-8000 München) zur Abdichtung gelegt. Die Deckplatte konnte anschließend auf den unteren Teil der Inkubationskammer aufgeschraubt werden. Über zwei Kanülen (Sterikan Einmalkanüle L 1; Fa. B. Braun Melsungen AG) und Silikongummischläuche (Fa. Menzel, D-8000 München) für den Ein- und Ausstrom des Versuchsmediums ist die Kammer mit einer Pumpe (Ismatek mp 25 G J-4)

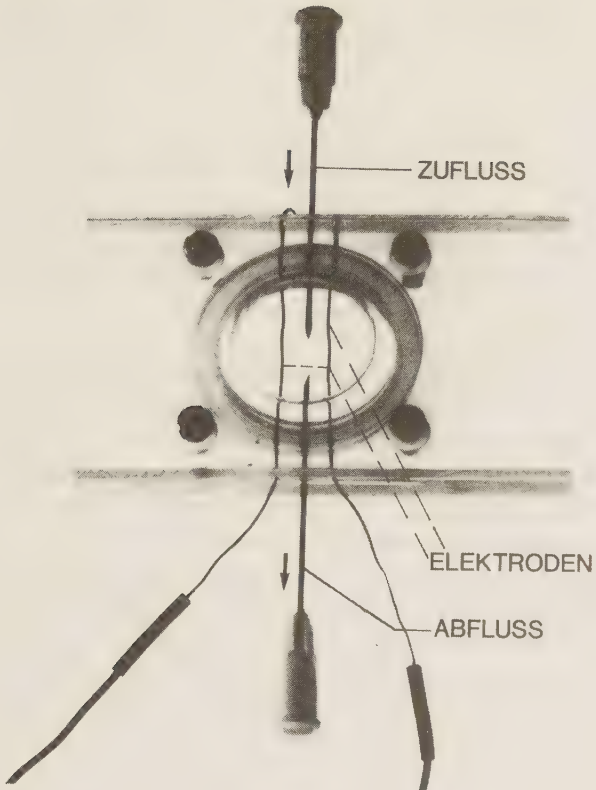


Abb. 2: Perfusionskammer mit Stimulationselektroden.

Das mit Rattenherzmuskelzellen bewachsene Deckgläschen wird in die "Grundplatte" der Inkubationskammer gelegt. Anschließend wird die "Deckplatte", nachdem Gummiringe zur Abdichtung und die zwei Platinelektroden eingespannt worden sind, aufgeschraubt.

Inhalt der Inkubationskammer = 1,5 ml;
Durchflußgeschwindigkeit = 3,8 ml/min.

Weitere Erläuterungen finden sich in Abschnitt 2.8.

verbunden, wodurch eine Zirkulation von Perfusionsmedium (Durchflußgeschwindigkeit = 3,8 ml/min) in der Inkubationskammer möglich ist.

Herzglykoside können sowohl am intakten Muskelpräparat neonataler Rattenherzen (108) als auch in kultivierten Rattenherzmuskelzellen (143) positiv chronotrop wirken. Dieser positiv chronotrope Effekt kann sich als "Treppen-Phänomen" auf die Kontraktionsgeschwindigkeit, die ein Maß für die Inotropie ist, auswirken (108).

Um g-Strophanthin-Effekte auf die Pulsationsamplitude und Kontraktionsgeschwindigkeit kultivierter Rattenherzmuskelzellen ohne störenden Einfluß von glykosidbedingten Frequenzeffekten untersuchen zu können, wurden die Zellen in der Inkubationskammer mit einer konstanten Frequenz stimuliert. Hierzu sind, wie in Abb. 2 dargestellt, zwei Platinelektroden, die in die Inkubationslösung eintauchen, in die Inkubationskammer eingespannt und mit einem externen Frequenzgeber verbunden (Grass SD Stimulator). Das elektrische Signal kann in seiner Dauer, Spannung und Frequenz variiert werden. Die Höhe der zur Reizung der Zellen erforderlichen Spannung ist von der Reizdauer abhängig. Da eine Erhöhung der Reizdauer über 5 msec keinen Einfluß auf die Grenzspannung hat (Experimente nicht gezeigt), wurde in allen Versuchen eine konstante Reizdauer von 10 msec gewählt. Bei Anlegen einer genügend hohen Spannung (40 V - 100 V; von Versuch zu Versuch unterschiedlich), konnte ein synchrones Schlagen aller Zellen des Zellrasens erreicht werden, wobei die gewählte Stimulationsfrequenz 10 - 20 Schläge/min über der jeweiligen Eigenfrequenz der Zellen lag.

Unter diesen Versuchsbedingungen wurde ein frequenzstabiles Schlagverhalten der Zellkulturen über 30 - 60 min aufrechterhalten, ohne daß eine Schädigung der Zellen durch die externe Reizung auftrat.

Als Perfusionsmedium diente CMRL-1415-ATM-Medium (s. 2.1 und 2.2) + 20 mM Hepes (pH = 7,40), wobei die K^+ -Konzentration auf 1,5 mM und die Ca^{2+} -Konzentration auf 0,3 mM bzw. 0,8 mM eingestellt wurde. Die gewählte K^+ -Konzentration erlaubt einen besseren Vergleich der unter Perfusionsbedingungen erhaltenen Meßparameter mit den Daten der Bindungsstudien und der Natriumpumpenaktivitätsmessung (0,75 mM K^+), ohne daß Arrhythmien, die durch niedrige Kaliumkonzentrationen bedingt sind, auftreten. Die Ca^{2+} -Konzentration wurde so niedrig gehalten, da Ca^{2+} -Ionen die Kontraktionsamplitude kultivierter Herzmuskelzellen erhöhen können (24, 84), wobei bei einer Konzentration von 1,3 mM Ca^{2+} im Perfusionsmedium die Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit maximal sind (Experimente nicht gezeigt).

Mit der beschriebenen Registrier- und Perfusionsanordnung läßt sich der Einfluß von g-Strophanthin auf die Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit kultivierter Rattenherzmuskelzellen untersuchen, wie aus dem Experiment der Abb. 14 ersichtlich ist. Anhand dieses Experiments soll die Durchführung und Auswertung von Versuchen zur Registrierung von Kontraktionsparametern kultivierter Rattenherzmuskelzellen exemplarisch dargestellt werden.

Rattenherzmuskelzellen wurden auf Deckgläschen drei bis fünf Tage lang gezüchtet. Das in die Inkubationskammer eingespannte Deckgläschen wurde zunächst für einige Minuten mit Medium ohne g-Strophanthin perfundiert, bis stabile Kontraktionsverhältnisse erreicht waren (= Kontrolle). Dieser Wert der Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit bei einer Stimulationsfrequenz von 100/min wurde gleich 100 % gesetzt. Danach erfolgte die Zugabe des strophanthinhaltigen Perfusionsmediums über das Schlauchsystem. Nachdem die Zunahme von Amplitude und Geschwindigkeit ein Maximum erreicht hatte (bei den gewählten g-Strophanthin-Konzentrationen nach fünf bis zehn Minuten), wurde erneut mit glykosidfreiem Medium perfundiert, wobei - wie aus Abb. 14 ersichtlich - bei den verwendeten g-Strophanthin-Kon-

zentrationen der Herzglykosideffekt immer rasch (im Minutenbereich) auswaschbar und reversibel war.

Während der gesamten Versuchsdauer von 35 Minuten wurde die Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit alle 30 Sekunden ausgemessen und in Prozent des Kontrollwertes ausgedrückt (s. Abb. 14). Auf diese Weise ist es möglich, eine Dosis-Wirkungskurve, wie in Abb. 15 dargestellt, aufzustellen, wobei in diesem Experiment immer nur die Wirkung einer g-Strophanthin-Konzentration mit einem Deckgläschen untersucht und jeweils der maximale Effekt angegeben wurde.

* * *

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Daten stellen Mittelwerte eng korrelierender Doppel- bzw. Dreifachmessungen dar. Alle gezeigten Experimente wurden mindestens dreimal unter identischen Bedingungen durchgeführt.

ERGEBNISSE

Die Charakterisierung eines Rezeptors erfordert den Nachweis der Bindung des Liganden an diesen Rezeptor und der aus dieser Ligandenbindung resultierenden zellulären Effekte (35). Zur Beschreibung des Herzglykosidrezeptors kultivierter Rattenherzzellen wurden deshalb zunächst spezifische Bindungsstellen für Herzglykoside charakterisiert (s. 3.1); in den folgenden Kapiteln wurde dann die Auswirkung dieser Herzglykosid-Bindungsstellen-Interaktion auf den aktiven Na^+/K^+ -Transport (s. 3.2 und 3.3) und auf das Kontraktionsverhalten (s. 3.4) der Zelle untersucht.

3.1 SPEZIFISCHE UND UNSPEZIFISCHE BINDUNG VON $[\text{}^3\text{H}]$ -g-STROPHANTHIN AN KULTIVIERTE HERZZELLEN NEONATALER RATTEN

Die Charakterisierung der Herzglykosid-Bindungsstellen wurde mittels $[\text{}^3\text{H}]$ -g-Strophanthin vorgenommen. Sie beinhaltet den Nachweis einer spezifischen zellulären Bindung von $[\text{}^3\text{H}]$ -g-Strophanthin (s. 3.1.1), die Ermittlung von Zahl und Affinität der spezifischen Bindungsstellen (s. 3.1.2) und die quantitative Beschreibung der Assoziations- und Dissoziationsreaktion (s. 3.1.3), des Einflusses von Kaliumionen (s. 3.1.4) sowie der Hitzedenaturierung (s. 3.1.5).

Zunächst war es erforderlich, Versuchsbedingungen auszuarbeiten, welche die Messung der $[\text{}^3\text{H}]$ -g-Strophanthin-Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen (Geschwindigkeit der Bindung von Strophanthin an die Bindungsstelle = Geschwindigkeit der Dissoziation des Strophanthins von dieser Bindungsstelle) erlauben.

3.1.1 Zeitabhängigkeit der [^3H]-g-Strophanthin-Bindung

Zur Messung der zellulären Bindung von [^3H]-g-Strophanthin wurden Herzmuskelzellen mit 6×10^{-8} M [^3H]-g-Strophanthin bei 37°C inkubiert. Das zellgebundene [^3H]-g-Strophanthin - gemessen in counts pro Minute (cpm) pro mg Zellprotein und bestimmt nach verschiedenen Zeiten (0,2 min - 360 min) - wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen (s. Abb. 3). Zur Ermittlung der spezifischen Bindung ($\square$ — $\square$) wurde die unspezifische Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M g-Strophanthin ($\triangle$ — $\triangle$) jeweils von der Gesamtbindung ($\bullet$ — $\bullet$) subtrahiert. Bezüglich der Definition und Höhe von spezifischer und unspezifischer Bindung sei auf den Abschnitt 2.4 verwiesen.

Einer initialen raschen Bindungsphase, die innerhalb der ersten 30 Minuten fast ganz abgeschlossen ist, überlagert sich ein langsamer, fast linearer Bindungsvorgang während der gesamten sechsstündigen Inkubationszeit. Letzterer wird hauptsächlich von der unspezifischen Bindung verursacht, so daß sich - wie aus Abb. 3 ersichtlich - bereits nach 60 Minuten Inkubationszeit ein Gleichgewicht der spezifischen [^3H]-g-Strophanthin-Bindung einstellt und über den gemessenen Zeitraum von 360 Minuten bestehen bleibt. Die Halbwertszeit des Bindungsvorgangs beträgt - aus Abb. 3 graphisch ermittelt - etwa 16 Minuten.

Ein in identischer Weise durchgeführtes Experiment mit Rattenherzbindegewebszellen ergab eine vergleichbare Bindungskinetik mit folgenden Ergebnissen: die Halbwertszeit beträgt etwa 70 Minuten; Gleichgewichtsbedingungen sind nach vier Stunden Inkubationszeit erreicht. Der Anteil der unspezifischen Bindung bei 6×10^{-8} M [^3H]-g-Strophanthin ist in Bindegewebszellen mit $(57 \pm 5) \%$ [MW $\pm$ SEM; n = 5] der gebundenen Radioaktivität höher als in Herzmuskelzellen (s. 2.4).

Aufgrund der vorliegenden Daten wurden alle Experimente mit einer vierstündigen Inkubationszeit durchgeführt, da auch bei

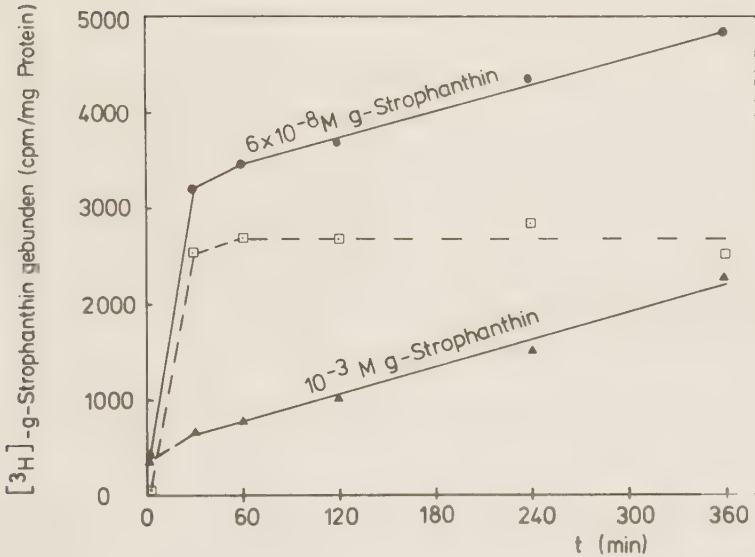


Abb. 3: Kinetik der $[^3\text{H}]\text{-g-Strophanthin}$ -Bindung in kultivierten Rattenherzmuskelzellen.

Inkubation von Rattenherzmuskelzellen (25 cm^2 Plastikkulturfläschchen) in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) bei 37°C in Gegenwart von $6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ bzw. $10^{-3} \text{ M g-Strophanthin}$ für die in der Abszisse angegebenen Zeiten.

Bestimmung der $[^3\text{H}]\text{-g-Strophanthin}$ -Bindung wie in METHODEN beschrieben.

$3,2 \cdot 10^6 \text{ cpm/Fläschchen}$; $0,3 \text{ mg Protein/Fläschchen}$;
Inkubationsvolumen = $4,1 \text{ ml}$; Aussaatdichte = $55.000 \text{ Zellen/cm}^2$.

Bezüglich weiterer experimenteller Details siehe MATERIALIEN UND METHODEN.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Dreifachwerte.

längerer Inkubation keine weitere Zunahme der spezifischen zellulären g-Strophanthin-Bindung erfolgt (= Gleichgewichtsbedingungen).

Aus Untersuchungen an Zellmembranen ist bekannt, daß K^+ -Ionen die g-Strophanthin-Bindung vermindern (50). Für das Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) wurde daher eine erniedrigte K^+ -Konzentration von 0,75 mM gewählt, bei der einerseits die Herzzellen noch nicht geschädigt sind (regelrechtes Kontraktionsverhalten und unveränderte Morphologie auch nach mehrstündiger Inkubation) und andererseits die g-Strophanthin-Bindung an die Bindungsstelle möglichst hoch ist (s. 3.1.4).

3.1.2 Konzentrationsabhängigkeit der [3H]-g-Strophanthin-Bindung

Mit der Messung der [3H]-g-Strophanthin-Bindung bei verschiedenen Strophanthinkonzentrationen unter Gleichgewichtsbedingungen (s. 3.1.1) können Zahl und Affinität der Herzglykosidbindungsstellen pro Herzzelle ermittelt werden (163). Hierzu wurden kultivierte Rattenherzzellen in Gegenwart steigender g-Strophanthin-Konzentrationen bei 37 °C für 240 Minuten in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) inkubiert. Das zellgebundene [3H]-g-Strophanthin wurde gegen die Gesamt-g-Strophanthin-Konzentration im Inkubationsmedium aufgetragen (s. Abb. 4 a).

Man erkennt in dem Experiment der Abb. 4 a eine biphasische Bindung von [3H]-g-Strophanthin. Die Bindungskurve flacht im Konzentrationsbereich von 10^{-7} M g-Strophanthin ab und steigt dann erneut bis etwa 10^{-5} M g-Strophanthin an. Eine Auftragung der Meßdaten nach Scatchard (163) ergibt einen gekrümmten Kurvenverlauf (s. Abb. 4 b). Unter der Annahme, daß es sich um zwei verschiedene Bindungsstellen handeln könnte, wurde mit den Bindungsdaten das Approximationsverfahren von Weidemann et al. (183) für zwei verschiedene Bindungsstellen angewendet. Mit

diesem Computerprogramm ließen sich dann die apparenten Dissoziationskonstanten (als Maß für die Affinität der Bindungsstelle zum Herzglykosid) für zwei verschiedene, voneinander unabhängige Bindungsstellen bestimmen. Eine hochaffine Bindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten K_D von $7,5 \times 10^{-8}$ M und einer niedrigen Bindungskapazität ($B_{\max} = 0,2$ pmol/mg Protein) und eine niederaffine Bindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten K_D von $2,3 \times 10^{-5}$ M und einer hohen Bindungskapazität ($B_{\max} = 5,3$ pmol/mg Protein) sind diesem Rechenmodell entsprechend möglich.

Eine Übersicht über die Mittelwerte von Dissoziationskonstanten und Bindungskapazitäten mehrerer Experimente findet sich in Tabelle 2.

Unter der Voraussetzung, daß eine g-Strophanthin-Bindungsstelle nur ein Glykosidmolekül spezifisch bindet (54), läßt sich aus der maximalen g-Strophanthin-Bindungskapazität/mg Zellprotein (s. Tab. 2) und dem Verhältnis von Zellprotein/Zellzahl (s. 2.4) die maximale Anzahl der Bindungsstellen je Zelle errechnen. Für Rattenherzmuskelzellen kann man auf diese Weise den Wert von etwa 80.000 hochaffiner ($n = 8$) und etwa 1.000.000 niederaffiner ($n = 8$) Bindungsstellen ermitteln.

Führt man identische Experimente, wie für Rattenherzmuskelzellen beschrieben, auch an Rattenherzbindegewebszellen durch, so finden sich ebenfalls zwei Klassen von g-Strophanthin-Bindungsstellen mit ähnlichen Dissoziationskonstanten, jedoch geringeren Bindungskapazitäten wie in Herzmuskelzellen (s. Tab. 2).

Die bisherigen Versuche wurden an intakten Herzzellen durchgeführt. Um die Frage zu klären, ob diese verschiedenen Klassen von g-Strophanthin-Bindungsstellen auch nach Zerstörung der Zellintegrität vorhanden sind, wurden dieselben Bindungsexperimente an isolierten Herzmuskelzellmembranen vorgenommen, die aus dem gleichen Ausgangsmaterial - den Herzen neonataler Ratten - erhalten wurden (bezüglich Methodik s. 2.7).

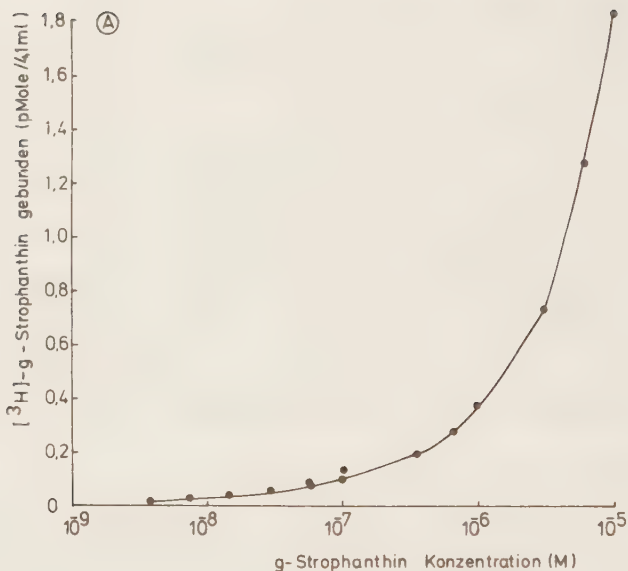


Abb. 4: Konzentrationsabhängigkeit der [^3H]-g-Strophanthin-Bindung in kultivierten Rattenherzmuskelzellen.

Abb. 4 a: Inkubation von Rattenherzmuskelzellen (25-cm²-Plastikkulturfläschchen) bei 37 °C für 240 Minuten in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) in Gegenwart von [^3H]-g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin.

1,0 mg Protein/Fläschchen; Inkubationsvolumen = 4,1 ml;
Aussaatdichte = 58.000 Zellen/cm².

Eingesetzte Radioaktivität/Fläschchen:

$0,2 \cdot 10^6$ cpm ($\hat{=}$ $3,9 \cdot 10^{-9}$ M g-Strophanthin)
 $0,4 \cdot 10^6$ cpm ($\hat{=}$ $7,8 \cdot 10^{-9}$ M g-Strophanthin)
 $0,8 \cdot 10^6$ cpm ($\hat{=}$ $1,6 \cdot 10^{-8}$ M g-Strophanthin)
 $1,7 \cdot 10^6$ cpm ($\hat{=}$ $3,1 \cdot 10^{-8}$ M g-Strophanthin)
 $3,4 \cdot 10^6$ cpm ($\hat{=}$ $6,2 \cdot 10^{-8}$ M g-Strophanthin) für alle weiteren Meßwerte.

Zur Ermittlung der spezifischen [^3H]-g-Strophanthin-Bindung wurde die unspezifische Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M g-Strophanthin (17 % der maximal gebundenen Radioaktivität) von der gesamten [^3H]-g-Strophanthin-Bindung subtrahiert.

SCATCHARD PLOT

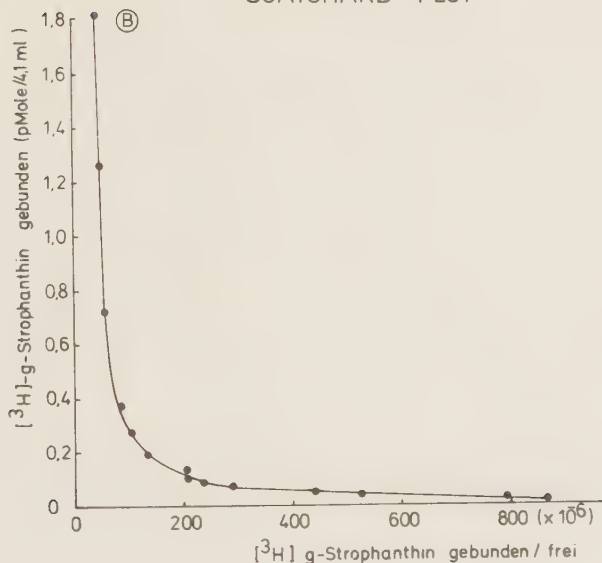


Abb. 4 b: Auftragung der Bindungsdaten aus Abb. 4 a nach Scatchard (163). Die Verwendung des Approximationsverfahrens von Weidemann et al. (183) ergibt zwei Klassen von Bindungsstellen mit folgenden Eigenschaften:

$$K_{D_1} = 7,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

$$K_{D_2} = 2,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

$$B_{\text{max}_1} = 0,2 \text{ pmol/mg Protein}$$

$$B_{\text{max}_2} = 5,3 \text{ pmol/mg Protein}$$

Bezüglich weiterer experimenteller Details siehe MATERIALIEN UND METHODEN.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Doppelwerte.

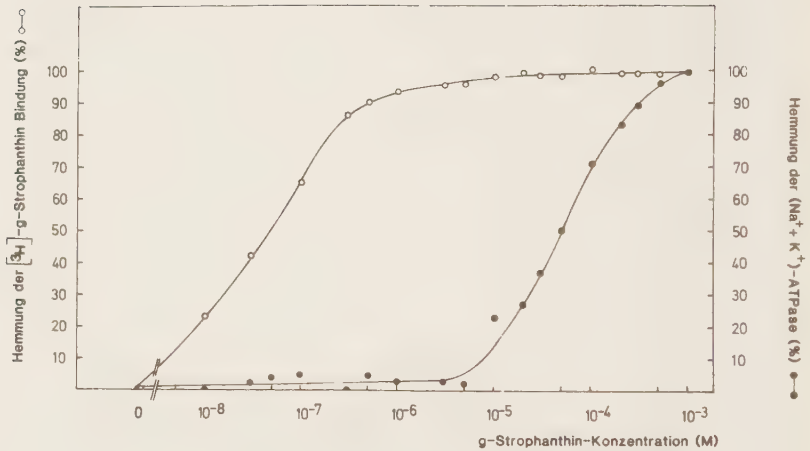


Abb. 5: Spezifische, konzentrationsabhängige Bindung von [³H]-g-Strophanthin an mit (Na⁺ + K⁺)-ATPase angereicherte Membranhomogenate neonataler Rattenherzen und strophanthininduzierte Hemmung der (Na⁺ + K⁺)-ATPase-Aktivität.

Inkubation von Rattenherzzellmembranen [0,82 mg Protein, (Na⁺ + K⁺)-ATPase-Aktivität = 0,07 µmol hydrolysiertes ATP/min · mg Protein bei 37 °C] mit steigenden Mengen an g-Strophanthin (10⁻⁸ M - 10⁻³ M) für 60 Minuten (Gesamtvolumen 2,0 ml) wie in METHODEN beschrieben. Bestimmung der (Na⁺ + K⁺)-ATPase-Aktivität aus 0,8 ml Enzymsuspension mit dem gekoppelten optisch-enzymatischen Test (166). Die Enzymaktivität in Gegenwart von 10⁻³ M g-Strophanthin wurde als unspezifisch von der Gesamtaktivität subtrahiert.

Bestimmung der [³H]-g-Strophanthin-Bindung aus 1,2 ml Enzymsuspension mit Hilfe der "Schnellen Filtrationsmethode" (52). Subtraktion der unspezifischen Bindung in Gegenwart von 10⁻³ M g-Strophanthin von der Gesamtbindung zur Ermittlung der spezifischen Bindung.

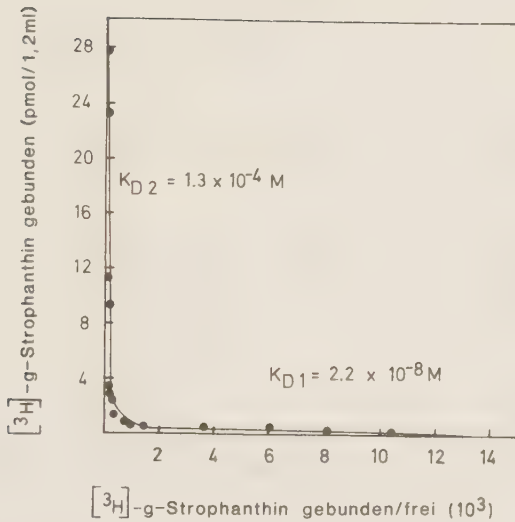


Abb. 6: Konzentrationsabhängige Bindung von $[^3\text{H}]\text{-g-Strophanthin}$ an mit $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ angereicherte Membranhomogenate neonataler Rattenherzen.

Auftragung der Bindungsdaten aus Abb. 5 nach Scatchard (163).

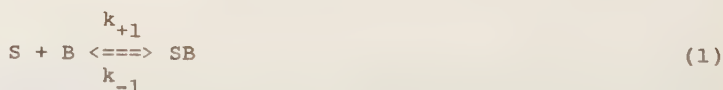
Die Berechnung nach dem Verfahren von Weidemann et al. (183) ergibt die in der Abbildung angegebenen Dissoziationskonstanten von zwei Bindungsstellen.

Die Auftragung der Daten der [^3H]-g-Strophanthin-Bindung aus Abb. 5 nach Scatchard (163) in Abb. 6 zeigt auch hier einen gekrümmten Kurvenverlauf. Die Anwendung des Computerprogramms von Weidemann et al. (183) auf diese Bindungsdaten ergibt eine hochaffine Bindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten K_D von $2,2 \times 10^{-8}$ M und niedriger Bindungskapazität (etwa 1 % der Bindungsstellen) und eine niederaffine Bindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten K_D von $1,3 \times 10^{-4}$ M.

3.1.3 Charakterisierung des Assoziations- und Dissoziationsvorgangs von [^3H]-g-Strophanthin

In den bisherigen Kapiteln wurde der Bindungsvorgang von [^3H]-g-Strophanthin an Herzzellen unter Gleichgewichtsbedingungen beschrieben. Nachfolgend sollen nun kinetische Messungen des Assoziations- und Dissoziationsprozesses dargestellt werden.

Die Bindung von g-Strophanthin (S) an seine Bindungsstelle (B) in Herzmuskelzellmembranen ist ein reversibler Vorgang und läßt sich mit dem Massenwirkungsgesetz beschreiben (46):



Unter Gleichgewichtsbedingungen gilt danach:

$$\frac{[\text{S}] \cdot [\text{B}]}{[\text{SB}]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_D [\text{M}] \quad (2)$$

In dieser Gleichung bedeutet:

- [S] = g-Strophanthin-Konzentration im Inkubationsmedium [M]
- [B] = Konzentration der freien g-Strophanthin-Bindungsstellen pro Inkubationsansatz [M]
- [SB] = Konzentration des g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexes pro Inkubationsansatz [M]
- k_{+1} = Assoziationsrate [$\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$]
- k_{-1} = Dissoziationsrate [sec^{-1}]
- K_D = Dissoziationskonstante [M]

Die Assoziationsrate k_{+1} ist ein Maß für die pro Zeiteinheit gebildeten g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexe, während die Dissoziationsrate k_{-1} angibt, wieviele der Glykosid-Bindungsstellen-Komplexe pro Zeiteinheit zerfallen.

Ersetzt man nun in Gleichung (2) $[B]$ durch $\{[B_{\max}] - [SB]\}$, wobei $[B_{\max}]$ die maximale Bindungskapazität der g-Strophanthin-Bindungsstelle angibt (s. Tab. 2), so läßt sich nach Umformung der Gleichung für jede g-Strophanthin-Konzentration $[S]$ die zugehörige Konzentration an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen $[SB]$ errechnen:

$$[SB] = \frac{[S] \cdot [B_{\max}]}{[K_D] + [S]} \quad (3)$$

Bei der Charakterisierung des Assoziations- und Dissoziationsprozesses von g-Strophanthin muß besonders die Existenz von zwei Bindungsstellen für Herzglykoside in kultivierten Rattenherzzellen Beachtung finden (s. 3.1.2). Je nach Höhe der g-Strophanthin-Konzentration während der Inkubationsperiode ergibt sich ein unterschiedliches Verhältnis der an die hoch- bzw. niederaffine Bindungsstelle gebundenen g-Strophanthin-Menge. So läßt sich z. B. für eine g-Strophanthin-Konzentration von 10^{-5} M mittels der Gleichung (3) eine Besetzung der hochaffinen Bindungsstelle mit 0,199 pmol/mg Protein und eine Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle mit 1,52 pmol/mg Protein errechnen, wobei dieser Berechnung die Daten (K_D und $B_{\max}$) der Tabelle 2 zugrunde liegen. Setzt man die maximale Bindungskapazität einer Bindungsstelle (s. Tab. 2) gleich 100 %, so kann man für jede g-Strophanthin-Konzentration auch die prozentuale Besetzung der Bindungsstelle ermitteln. In dem Rechenbeispiel mit 10^{-5} M g-Strophanthin ist die hochaffine Bindungsstelle dann zu 99,5 % und die niederaffine Bindungsstelle zu 58,5 % mit g-Strophanthin besetzt.

Für weitere g-Strophanthin-Konzentrationen ergeben sich folgende Daten:

[g-Strophanthin]	Verhältnis der an die hoch- bzw. nieder- affine Bindungsstelle gebundenen g-Stro- phanthin-Menge
10^{-8} M	13,0
10^{-7} M	4,2
10^{-6} M	0,6
10^{-5} M	0,13

3.1.3.1 Bestimmung der Assoziationsrate

Nach vierstündiger Vorinkubation der Rattenherzmuskelzellen in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) bei 37 °C wurde die spezifische [^3H]-g-Strophanthin-Bindung in cpm/mg Protein zu verschiedenen Inkubationszeiten (0,2 min - 3 min) bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen (s. Abb. 7 a). Im gleichen Experiment wurde eine konzentrationsabhängige Bindung von [^3H]-g-Strophanthin (s. 3.1.2) zur Bestimmung der maximal vorhandenen Bindungsstellen (B_{max}) pro mg Protein und der Dissoziationskonstanten K_D durchgeführt.

Bei der im Experiment der Abb. 7 a gewählten [^3H]-g-Strophanthin-Konzentration von $8,7 \times 10^{-8}$ M bindet die hochaffine Bindungsstelle etwa 68 % und die niederaffine Bindungsstelle etwa 32 % der gesamten gebundenen Strophanthinmenge, so daß die Assoziationsreaktion eine Bindung primär an die hochaffine Bindungsstelle darstellt.

Nach Erdmann und Schoner (42) kann die Assoziationsrate k_{+1} aus einer Reaktionsgleichung 2. Ordnung berechnet werden, wenn die Bildung des g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexes einer bimolekularen Reaktionskinetik folgt und die Anfangskonzentration des freien Glykosids bekannt ist. Dazu werden die einzelnen

Meßwerte in die Gleichung für eine Reaktion 2. Ordnung eingesetzt und die Assoziationszeit t gegen den in der Ordinate von Abb. 7 c angegebenen Ausdruck aufgetragen. Die lineare Beziehung zeigt, daß die Bindung des g-Strophanthins an seine Bindungsstelle mit einer bimolekularen Reaktion vereinbar ist. Aus dem Anstieg der Geraden läßt sich dann die Assoziationsrate k_{+1} ermitteln.

Gleichung für eine Reaktionskinetik 2. Ordnung:

$$k_{+1} = \frac{2,303}{([G_0] - [R]) \cdot t} \cdot \log \frac{[R] \cdot ([G_0] - [GR_x])}{[G_0] \cdot ([R] - [GR_x])}$$

In dieser Gleichung bedeutet:

$[G_0]$ = g-Strophanthin-Anfangskonzentration im Inkubationsansatz [M]

$[R]$ = Anfangskonzentration der freien Bindungsstellen (= $B_{\max}$) pro Inkubationsansatz [M]

$[GR_x]$ = Konzentration an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen pro Inkubationsansatz zur Zeit $t = x$ [M]

t = Reaktionszeit [sec]

Aus der Steigung der Kurve in Abb. 7 c errechnet sich eine Assoziationsrate der g-Strophanthin-Bindung in Rattenherzmuskelzellen von $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. In identischer Weise durchgeführte Experimente ergaben folgende weiteren Werte für k_{+1} :

$$1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1} \text{ bzw. } 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}.$$

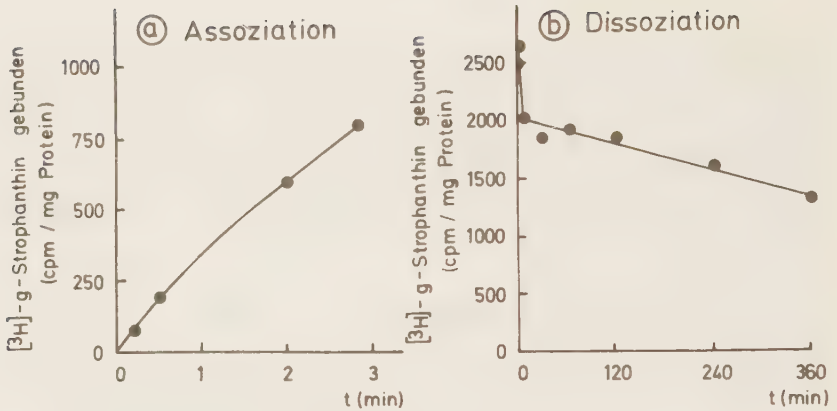


Abb. 7: Assoziations- und Dissoziationsraten der $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin-Bindung in kultivierten Rattenherzmuskelzellen.

Abb. 7 a und 7 b:

Inkubation von Rattenherzmuskelzellen (25-cm^2 -Plastikkulturfläschchen) in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) für 240 Minuten bei 37°C ohne (Assoziation) bzw. in Gegenwart von $8,7 \cdot 10^{-8}\text{ M}$ $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin (Dissoziation).

Assoziation (Abb. 7 a):

Danach Zugabe von $8,7 \cdot 10^{-8}\text{ M}$ $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin für die in der Abszisse angegebenen Zeiten und Bestimmung der spezifischen $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin-Bindung durch Subtraktion der unspezifischen Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M g-Strophanthin von der Gesamtbindung.

$4,3 \cdot 10^6\text{ cpm/Fläschchen}$; $1,2\text{ mg Protein/Fläschchen}$;
Inkubationsvolumen = $4,1\text{ ml}$; Aussaatdichte = $80.000\text{ Zellen/cm}^2$.

Bestimmung der maximalen g-Strophanthin-Bindungskapazität B_{max} und der Dissoziationskonstanten K_D im gleichen Experiment wie in der Legende zu Abb. 4 beschrieben.

$$K_{D1} = 1,8 \cdot 10^{-8}\text{ M}$$

$$K_{D2} = 2,5 \cdot 10^{-6}\text{ M}$$

$$B_{\text{max}1} = 0,26\text{ pmol/mg Protein}$$

$$B_{\text{max}2} = 2,7\text{ pmol/mg Protein}$$

Dissoziation (Abb. 7 b):

Danach Ermittlung der spezifischen $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin-Bindung nach den in der Abszisse angegebenen Zeiten wie in METHODEN₊ beschrieben. Bestimmung der unspezifischen Bindung in Gegenwart von 20 mM K^+ .

$4,3 \cdot 10^6\text{ cpm/Fläschchen}$; $0,9\text{ mg Protein/Fläschchen}$;
Inkubationsvolumen = $4,1\text{ ml}$; Aussaatdichte = $80.000\text{ Zellen/cm}^2$.

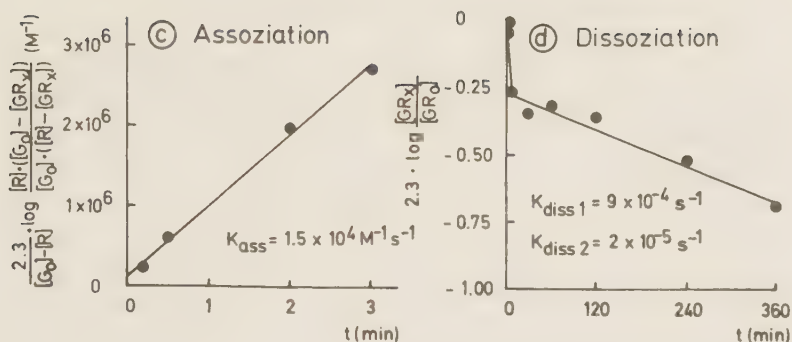


Abb. 7 c und 7 d:

Die Daten der [3H]-g-Strophanthin-Assoziations- und Dissoziationskinetik wurden in die Reaktionsgleichungen für die Reaktion 1. Ordnung (Abb. 7 d; Dissoziation) bzw. 2. Ordnung (Abb. 7 c; Assoziation) eingesetzt und gegen die Zeit aufgetragen. Bezüglich weiterer Einzelheiten siehe 3.1.3.1 und 3.1.3.2.

Abb. 7 c: $[G_0] = 8,7 \cdot 10^{-8} M$
 $[R] = 7,4 \cdot 10^{-11} M$ (bestimmt aus dem Scatchard Plot)

Durch lineare Regression wurde folgende Geradengleichung erhalten:

$$y = 1,15 \cdot 10^5 + 8,81 \cdot 10^5 \cdot x; \quad r = 0,99$$

Abb. 7 d:

Durch lineare Regression wurden folgende Geradengleichungen erhalten:

- 1) $y = 0,012 - 0,056 \cdot x; \quad r = 0,99; \quad x = 0, 1,5 \text{ und } 5 \text{ min}$
- 2) $y = -0,223 - 1,272 \cdot 10^{-3} \cdot x; \quad r = 0,99; \quad x = 30 \text{ bis } 360 \text{ min}$

Allen Berechnungen liegt die Annahme zugrunde, daß die Bindungsstellen der Rattenherzmuskelzellen - als Monolayer gewachsen - für g-Strophanthin ebenso frei zugänglich sind wie die Bindungsstellen von suspendierten Herzzellen.

Bezüglich weiterer experimenteller Details siehe MATERIALIEN UND METHODEN.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Doppel- bzw. Dreifachwerte.

3.1.3.2 Bestimmung der Dissoziationsrate

Die Dissoziation eines Liganden von einer spezifischen Bindungsstelle läßt sich durch eine Reaktionskinetik 1. Ordnung beschreiben:

$$k_{-1} = -2,303 \cdot \log \frac{[GR_x]}{[GR_0]} \cdot \frac{1}{t}$$

In dieser Gleichung bedeutet:

k_{-1} = Dissoziationsrate [sec⁻¹]

$[GR_x]$ = Konzentration an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen im Inkubationsansatz zur Zeit $t = x$ [M]

$[GR_0]$ = Konzentration an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen im Inkubationsansatz zur Zeit $t = 0$ [M]

t = Dissoziationszeit [sec]

Graphisch aufgetragen (Abszisse: Dissoziationszeit t ; Ordinate: $2,3 \cdot \log [GR_x] / [GR_0]$) findet sich eine Gerade, aus deren Steigung die Dissoziationsrate k_{-1} berechnet werden kann. Existieren mehrere Bindungsstellen, so erhält man bei dieser Art der Darstellung keine Gerade, sondern - je nach Zahl der unterschiedlichen Bindungsstellenklassen - gekrümmte Kurvenverläufe. Dieser Sachverhalt soll an nachfolgendem Gedankenexperiment näher veranschaulicht werden (s. Abb. 8):

Eine Herzmuskelzelle besitze eine hoch- und niederaffine Bindungsstelle, die im Gleichgewichtszustand jeweils 50 % der Gesamtligandenmenge binden. Die Dissoziationsrate der niederaffinen Bindungsstelle sei $9 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ und diejenige der hochaffinen Bindungsstelle $2 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$. Der Dissoziationsprozeß des Liganden von dieser Zelle, der in Wirklichkeit gleichzeitig sowohl von der hoch- als auch der niederaffinen Bindungsstelle abläuft, läßt sich gedanklich in eine Dissoziation von der hochaffinen und der niederaffinen Bindungsstelle auftrennen. Verwendet man die Gleichung für eine Reaktionskinetik 1. Ord-

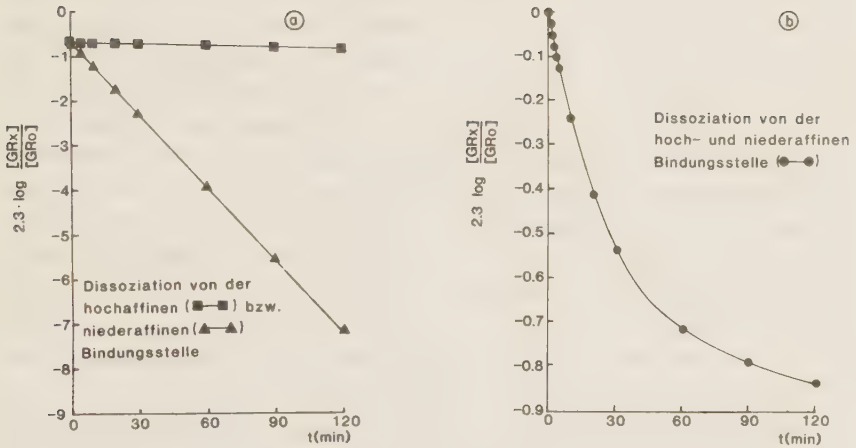


Abb. 8: Dissoziation von zwei Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität zum Liganden (Gedankenexperiment)

Eine Zelle besitze zwei Bindungsstellen für den Liganden. Sowohl die hochaffine als auch die niederaffine Bindungsstelle binde im Gleichgewichtszustand 50 % der Gesamtligandenmenge. Die Dissoziationsrate der hochaffinen Bindungsstelle betrage $2 \cdot 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ und die der niederaffinen Bindungsstelle $9 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$.

Abb. 8 a: Dargestellt ist der mit einer Reaktionskinetik 1. Ordnung vereinbare Dissoziationsprozeß von jeder der zwei Bindungsstellen.

$[GR_0]$ = Konzentration an Liganden-Bindungsstellen-Komplexen (hoch- und niederaffin!) zur Zeit $t = 0$.

$[GR_x]$ = Konzentration an Liganden-Bindungsstellen-Komplexen (hoch- bzw. niederaffin!) zur Zeit $t = x$.

Abb. 8 b: Dargestellt ist der gleichzeitig ablaufende Dissoziationsvorgang von den zwei Bindungsstellen.

$[GR_0]$ = Konzentration an Liganden-Bindungsstellen-Komplexen (hoch- und niederaffin!) zur Zeit $t = 0$.

$[GR_x]$ = Konzentration an Liganden-Bindungsstellen-Komplexen (hoch- und niederaffin!) zur Zeit $t = x$.

nung und trägt man die Dissoziationszeit t gegen den Ausdruck $2,3 \cdot \log [GR_x] / [GR_0]$ auf, so findet sich für den Dissoziationsvorgang von jeder der beiden Bindungsstellen eine Gerade (s. Abb. 8 a). Der "wirkliche" Dissoziationsablauf setzt sich jedoch aus den in Abb. 8 a gezeigten "Einzeldissoziationen" zusammen und ist in Abb. 8 b dargestellt. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Dissoziationsraten der beiden Bindungsstellen ergibt sich jetzt ein nichtlinearer Kurvenverlauf. Aus der Steigung des Anfangsteils und des Endteils der Kurve läßt sich graphisch näherungsweise die Dissoziationsrate der jeweiligen Bindungsstelle ermitteln.

Im Experiment der Abbildung 7 b wurde die Dissoziation von [3H]-g-Strophanthin von Herzmuskelzellen gemessen:

Die Zellkulturen wurden in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) bei 37 °C für 240 Minuten in Gegenwart von [3H]-g-Strophanthin inkubiert (Gleichgewichtsbedingungen; s. 3.1.1). Durch Messung der verbliebenen Radioaktivität nach verschiedenen Dissoziationszeiten (0 min - 360 min) konnte das Ausmaß der Dissoziation von [3H]-g-Strophanthin in strophanthinfreiem Medium bestimmt werden (s. Abb. 7 b).

Trägt man die Meßdaten in einem halblogarithmischen Maßstab auf (Ordinate: $2,3 \cdot \log [GR_x] / [GR_0]$; Abszisse: Dissoziationszeit t), so erhält man einen nichtlinearen Kurvenverlauf (s. Abb. 7 d). Der Befund ist mit dem Vorliegen von zwei unterschiedlichen Klassen von Herzglykosidbindungsstellen vereinbar (vgl. Abb. 8) und steht in Einklang mit den Scatchard-Plot-Daten (s. 3.1.2). Aus der Steigung des Anfangs- bzw. Endteils der Kurve in Abb. 7 d lassen sich graphisch näherungsweise folgende Dissoziationsraten ermitteln: $9 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ ($T_{1/2} = 12 \text{ min}$) bzw. $2 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ ($T_{1/2} = 575 \text{ min}$); die Dissoziationsrate der "schnellen Phase" kann aufgrund methodisch-experimenteller Grenzen zu niedrig bestimmt sein. Die in diesem Versuch erhaltenen Werte der Dissoziationsrate konnten in weiteren Experimenten, in denen auch die "schnelle Phase" detaillierter unter-

sucht wurde, bestätigt werden (Experimente nicht gezeigt). Es ergaben sich folgende Mittelwerte für die Dissoziationsraten: $(1,4 \pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ [MW $\pm$ SD; n = 5] bzw. $(2,1 \pm 0,4) \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ [MW $\pm$ SD; n = 6].

Aus dem Experiment der Abb. 7 b ist ersichtlich, daß etwa 25 % des spezifisch gebundenen [^3H]-g-Strophanthins rasch von der Zelle abdissoziiert. Dieser Wert korreliert gut mit der Bindung an die niederaffine Bindungsstelle in Gegenwart der gewählten [^3H]-g-Strophanthin-Konzentration von $8,7 \times 10^{-8} \text{ M}$ von etwa 17 % der gesamten gebundenen Strophanthinmenge (s. 3.1.3), so daß die "rasche Dissoziationsphase" einer Dissoziation von der niederaffinen Bindungsstelle entsprechen dürfte.

Ein gekrümmter Scatchard Plot kann nicht nur mehr als eine Bindungsstelle anzeigen, sondern er kann auch auf das Vorliegen einer negativen Kooperativität des Bindungsvorgangs hinweisen (33). Diese beiden Möglichkeiten lassen sich im Dissoziationsexperiment unterscheiden. Im Falle einer negativen Kooperativität müßte die Abdissoziation in Gegenwart sehr hoher g-Strophanthin-Konzentrationen wesentlich schneller erfolgen, während bei Existenz zweier Bindungsstellen der biphasische Dissoziationsvorgang unbeeinflusst bleiben muß.

In kultivierten Rattenherzmuskelzellen hat die Gegenwart hoher g-Strophanthin-Konzentrationen ($10^{-4} \text{ M} - 10^{-3} \text{ M}$) im Inkubationsmedium während der Dissoziation keinerlei Einfluß auf den Dissoziationsprozeß (Experimente nicht gezeigt).

Durch nicht ausreichende Spülvorgänge am Ende eines Bindungsexperiments im Extrazellulärraum verbliebenes g-Strophanthin kann für einen gekrümmten Kurvenverlauf in einer Auftragung der Bindungsdaten und Scatchard (163) verantwortlich sein. Um derartige Artefakte auszuschließen, wurde die Auswaschkinetik von ^{14}C -Inulin - einem Meßparameter für den Extrazellulärraum in kultivierten Rattenherzmuskelzellen (14) - bestimmt (identische

Durchführung wie g-Strophanthin-Dissoziationsexperimente). Sie zeigt ein abweichendes Verhalten im Vergleich zu dem in Abb. 7 b und 7 d gezeigten Dissoziationsprozeß von [^3H]-g-Strophanthin, wobei die Halbwertszeit deutlich kürzer als $T_{1/2}$ der "raschen Dissoziationsphase" von g-Strophanthin ist (Experimente nicht gezeigt). Die rasche Abdissoziation von g-Strophanthin kann somit nicht durch einen Auswaschprozeß aus dem Extrazellulärraum erklärt werden.

3.1.3.3 Temperaturabhängigkeit der [^3H]-g-Strophanthin-Bindung

Zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf die in 3.1.3.1 und 3.1.3.2 beschriebenen Assoziations- und Dissoziationsvorgänge wurde in kultivierten Rattenherzmuskelzellen die Assoziation des [^3H]-g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexes für $t = 25 \text{ sec}$ und $t = 3 \text{ min}$ ([^3H]-g-Strophanthin-Konzentration im Inkubationsmedium = $6,7 \times 10^{-8} \text{ M}$; Assoziation vorwiegend an die hochaffine Bindungsstelle - s. 3.1.3.1) und die Dissoziation für $t = 60 \text{ min}$ und $t = 12 \text{ h}$ (vorwiegend Abdissoziation von der hochaffinen Bindungsstelle!; s. 3.1.3.2) bei unterschiedlicher Temperatur des Inkubationsmediums bestimmt und die zugehörigen Assoziations- und Dissoziationsrate berechnet (s. 3.1.3.1 und 3.1.3.2).

Nachfolgende Resultate wurden erhalten:

Assoziation		Dissoziation	
Temperatur	k_{+1}	Temperatur	k_{-1}
	$[\text{M}^{-1} \text{ sec}^{-1}]$		sec^{-1}
9 °C	$3,43 \cdot 10^3$	10 °C	$1,07 \cdot 10^{-6}$
19 °C	$1,39 \cdot 10^4$	22 °C	$1,28 \cdot 10^{-5}$
26 °C	$2,46 \cdot 10^4$	37 °C	$3,13 \cdot 10^{-5}$
34 °C	$3,96 \cdot 10^4$		

Aus obigen Daten erkennt man eine deutliche Abhängigkeit sowohl des Assoziations- als auch des Dissoziationsvorgangs (von der hochaffinen Bindungsstelle) von der Temperatur des Inkubationsmediums, indem sowohl die Assoziationsrate k_{+1} als auch die Dissoziationsrate k_{-1} mit steigender Temperatur zunimmt.

3.1.3.4 Bestimmung der Aktivierungsenergie

Die Herzglykosidbindung an isolierte Zellmembranen ist eine temperaturabhängige Reaktion, die einer Aktivierungsenergie bedarf (42). Wie in 3.1.3.3 gezeigt wurde, stellt die Bindung von [^3H]-g-Strophanthin an kultivierte Rattenherzmuskelzellen auch einen temperaturabhängigen Vorgang dar.

Nachfolgend soll nun die Aktivierungsenergie für die Assoziations- und Dissoziationsreaktion in kultivierten Rattenherzmuskelzellen ermittelt werden.

Der Zusammenhang von Aktivierungsenergie und Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten läßt sich mit der von Arrhenius angegebenen Gleichung (in logarithmierter Form!) beschreiben:

$$\ln k = A - \frac{E_a}{R \cdot T}$$

In dieser Gleichung bedeutet:

- $\ln k$ = natürlicher Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten
 A = Proportionalitätsfaktor
 E_a = Aktivierungsenergie [$\frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$]
 R = allgemeine Gaskonstante [$\frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$]
 T = absolute Temperatur [K]

Bei der Arrhenius-Gleichung in logarithmierter Form handelt es sich um eine Geradengleichung, wenn man $\ln k$ gegen $1/T$ aufträgt. Die Steigung der Geraden ist E_a/R , woraus - da R als Konstante bekannt ist - die Aktivierungsenergie berechnet werden kann. Sie beträgt - unter Zugrundelegung der Daten aus 3.1.3.3 - für den Assoziationsvorgang (überwiegend an die hochaffine Bindungsstelle; s. 3.1.3.1) 17 kcal/mol (73 kJ/mol; $Q_{10} = 2,6$) und für den Dissoziationsvorgang von der hochaffinen Bindungsstelle 21 kcal/mol (88 kJ/mol; $Q_{10} = 3,2$).

3.1.4 Einfluß von K^+ -Ionen auf die [3H]-g-Strophanthin-Bindung

3.1.4.1 Abhängigkeit der [3H]-g-Strophanthin-Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen von der extrazellulären K^+ -Konzentration

Kaliumionen beeinflussen die Bindung von Herzglykosiden an ihre Bindungsstelle (50). Um diese Interaktion an kultivierten Herzzellen näher zu charakterisieren und zu quantifizieren, wurden Rattenherzmuskelzellen und Rattenherzbindegewebszellen in Inkubationsmedium (CMRL-1415-ATM-Medium + 2,5 % dialysiertes fötales Kälberserum + 2,5 % dialysiertes Pferdeserum + 20 mM Hepes) in Gegenwart unterschiedlicher K^+ -Konzentrationen (0 mM - 20 mM) bei 37 °C für 240 Minuten inkubiert. Das zellgebundene [3H]-g-Strophanthin - gemessen in cpm/mg Protein - ist in Abb. 9 gegen die K^+ -Konzentration im Inkubationsmedium aufgetragen.

Rattenherzmuskelzellen weisen ein Maximum der [3H]-g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 0,75 mM K^+ auf. Eine weitere Erhöhung der K^+ -Konzentration im Inkubationsmedium führt zu einer Verminderung der [3H]-g-Strophanthin-Bindung um 20 % bei 1,0 mM K^+ , um 35 % bei 2,7 mM K^+ , um 54 % bei 5,4 mM K^+ und um 61 % bei 20 mM K^+ (s. Abb. 9 a).

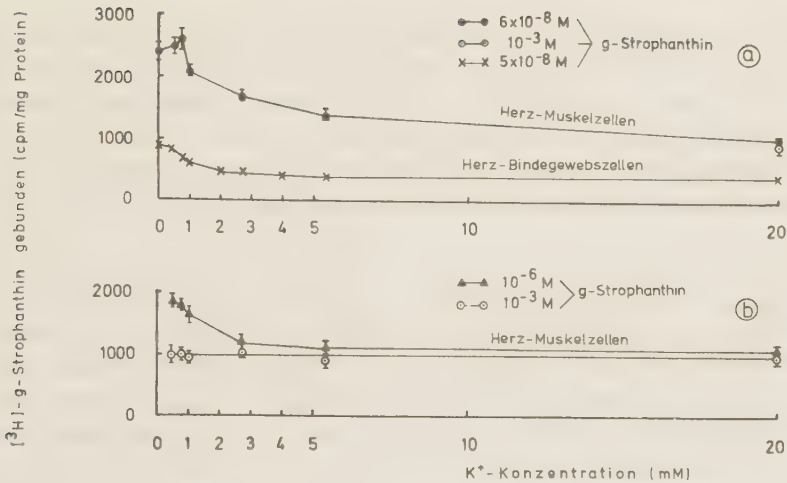


Abb. 9: Einfluß von Kalium auf die $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin-Bindung in kultivierten Rattenherzzellen unter Gleichgewichtsbedingungen

Inkubation von Rattenherzmuskelzellen bzw. Rattenherzbindegewebszellen (25-cm^2 -Plastikkulturfläschchen) bei 37°C für 240 Minuten in Serum enthaltendem (2,5 % dialysiertes Pferdeserum + 2,5 % dialysiertes fötales Kälberserum) Hepes-(20 mM)-gepuffertem CMRL-1415-ATM-Medium ($\text{pH} = 7,40$) in Gegenwart der in der Abbildung angegebenen g-Strophanthin-Konzentrationen und der in der Abszisse angeführten K^+ -Konzentrationen.

Bestimmung der $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin-Bindung wie in METHODEN beschrieben.

Abb. 9 a:

Herzmuskelzellen: $3,6 \cdot 10^6$ cpm/Fläschchen; 0,8 mg Protein/Fläschchen; Inkubationsvolumen = 4,1 ml; Aussaatdichte = 48.000 Zellen/ cm^2 .

Herzbindegewebszellen: $2,8 \cdot 10^6$ cpm/Fläschchen; 0,5 mg Protein/Fläschchen; Inkubationsvolumen 4,1 ml.

Abb. 9 b:

Herzmuskelzellen: $3,8 \cdot 10^6$ cpm/Fläschchen; 1,8 mg Protein/Fläschchen; Inkubationsvolumen = 4,1 ml; Aussaatdichte = 81.000 Zellen/ cm^2 .

Bezüglich weiterer experimenteller Details siehe MATERIALIEN UND METHODEN.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD ($n = 3$) bei Herzmuskelzellen und Mittelwerte eng korrelierender Doppelwerte bei Herzbindegewebszellen.

Durch Zugabe von 10^{-3} M g-Strophanthin kann die Bindung in Gegenwart von 20 mM K^+ nicht mehr weiter reduziert werden (s. Abb. 9 a und b). Die [3H]-g-Strophanthin-Bindung bei 20 mM K^+ entspricht somit derjenigen in Gegenwart hoher g-Strophanthin-Konzentrationen, wobei es sich in beiden Fällen um nicht-spezifische Bindungsvorgänge (z. B. Adhäsionen an Zellbestandteile) handelt (s. 2.4).

Der in Abb. 9 a gezeigte Abfall der [3H]-g-Strophanthin-Bindung bei niedrigen ($< 0,75$ mM) K^+ -Konzentrationen wird auch in kultivierten intakten Hühnerherzzellen gefunden (188), läßt sich jedoch an Zellmembranen nicht beobachten (50). Die Ursache dieses Phänomens ist nicht geklärt. Unter Umständen ist dafür eine Zellschädigung in Gegenwart niedriger K^+ -Konzentrationen anzuschuldigen.

Rattenherzbindegewebszellen weisen ebenso wie Rattenherzmuskelzellen eine deutliche, wenn auch nicht ganz so stark ausgeprägte Abhängigkeit der [3H]-g-Strophanthin-Bindung von der Kaliumkonzentration auf (s. Abb. 9 a). In dem Experiment der Abb. 9 a zeigt sich ein Bindungsmaximum in Gegenwart von 0 mM K^+ . Auch hier gelingt es durch hohe K^+ -Konzentrationen (20 mM K^+) die spezifische [3H]-g-Strophanthin-Bindung vollständig zu unterdrücken (Experimente nicht gezeigt).

Aufgrund der bisher dargestellten Ergebnisse wurde für die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Experimente, soweit nicht anders angegeben, eine K^+ -Konzentration von 0,75 mM im Inkubationsmedium gewählt, da in diesem Bereich die Bindung von [3H]-g-Strophanthin an die Rattenherzmuskelzelle und Rattenherzbindegewebszelle im maximalen Bereich liegt und gleichzeitig eine dauerhafte Schädigung der Zelle bei vierstündiger Inkubationszeit ausgeschlossen werden konnte (regelrechtes Kontraktionsverhalten und unveränderte Morphologie).

Konzentrationsabhängige Bindungsexperimente mit Rattenherzmuskelzellen weisen auf die Existenz zweier g-Strophanthin-Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität für Herzglykoside hin (s. 3.1.2). Mit der im Experiment von Abb. 9 a verwendeten g-Strophanthin-Konzentration von 6×10^{-8} M läßt sich primär der K^{+} -Einfluß auf die Bindung an die hochaffine Bindungsstelle untersuchen (unter Zugrundelegung der Daten aus Tab. 2 ergibt sich nach dem Massenwirkungsgesetz eine Besetzung der hochaffinen Bindungsstelle von etwa 65 % und der niederaffinen Bindungsstelle von weniger als 1 %; vgl. 3.1.3).

Um die Frage der K^{+} -Abhängigkeit der g-Strophanthin-Bindung an die niederaffine Bindungsstelle weiter zu klären, wurde die [3H]-g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-6} M, nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin bei unterschiedlichen K^{+} -Konzentrationen (0,45 mM - 20 mM) gemessen (s. Abb. 9 b). Bei einer g-Strophanthin-Konzentration von 10^{-6} M sind ca. 0,19 pmol/mg Protein spezifisch an die hochaffine und 0,32 pmol/mg Protein spezifisch an die niederaffine Bindungsstelle gebunden. Diese Werte entsprechen einer ca. 97prozentigen Besetzung der hochaffinen und einer ca. 12prozentigen Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle (den Befunden liegen die Daten der Tabelle 2 zugrunde; bezüglich der Berechnung s. 3.1.3).

Auch unter diesen Inkubationsbedingungen läßt sich durch Erhöhung der extrazellulären K^{+} -Konzentrationen die spezifische g-Strophanthin-Bindung bis auf unspezifische Werte reduzieren (s. Abb. 9 b). Es zeigt sich ferner eine deutliche K^{+} -Abhängigkeit, woraus zu folgern ist, daß in kultivierten Rattenherzmuskelzellen auch die Bindung an die niederaffine Herzglykosidbindungsstelle, ebenso wie diejenige an die hochaffine Herzglykosidbindungsstelle, kaliumabhängig ist.

3.1.4.2 Abhängigkeit des [^3H]-g-Strophanthin-Assoziations- und Dissoziationsvorgangs von der extrazellulären K^+ -Konzentration

Durch Messung des Assoziations- und Dissoziationsvorgangs der [^3H]-g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart unterschiedlicher K^+ -Konzentrationen (experimentelle Durchführung wie in 3.1.3.1 und 3.1.3.2) sollte nun weiter geklärt werden, welche Phase der Bindung (Assoziation, Dissoziation) durch K^+ -Ionen beeinflusst wird und somit für die in 3.1.4.1 beschriebenen Befunde verantwortlich ist.

In dem Experiment der Abb. 10 erkennt man den deutlichen Einfluß der K^+ -Konzentration im Inkubationsmedium auf den Assoziationsprozeß. Die [^3H]-g-Strophanthin-Bindung nach einem dreiminütigen Assoziationsvorgang in Gegenwart von 3,5 mM K^+ beträgt nur noch 25 % des Kontrollwertes (in Gegenwart von 0,75 mM K^+). Eine weitere Erhöhung der K^+ -Konzentration auf 5,4 mM führt zu einer weiteren Reduktion der Bindung auf 17 % des Kontrollwertes. Im Gegensatz zu der deutlichen Abhängigkeit des Assoziationsvorgangs von der K^+ -Konzentration bleibt die Dissoziation (gemessen im Zeitraum von 5 min bis 12 h, also die Dissoziation von der hochaffinen Bindungsstelle; s. 3.1.3.2) von der K^+ -Konzentration im Inkubationsmedium unbeeinflusst.

Somit ist alleine die Hemmung der g-Strophanthin-Assoziationsreaktion für den K^+ -Einfluß auf die [^3H]-g-Strophanthin-Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen verantwortlich.

3.1.5 Einfluß der Hitzedenaturierung auf die [^3H]-g-Strophanthin-Bindung

Durch 60minütige Inkubation bei 60 °C läßt sich in isolierten Herzzellmembranen die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität und die spezifische Herzglykosidbindung vollständig unterdrücken (54). In-

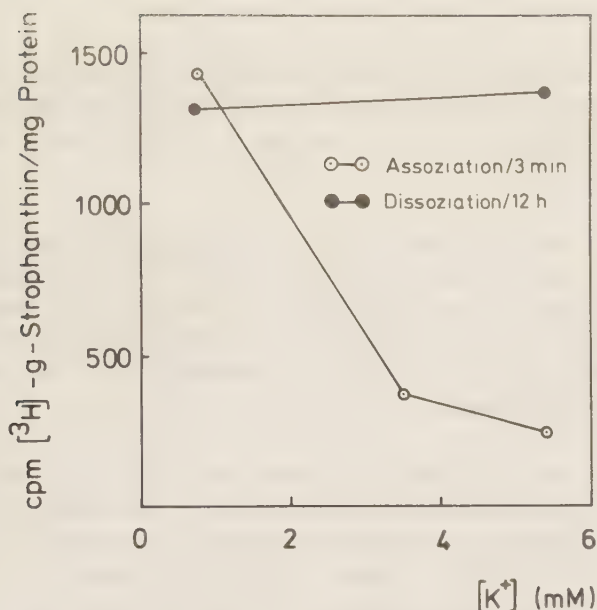


Abb. 10: Einfluß von Kalium auf die g-Strophanthin-Assoziation und -Dissoziation in kultivierten Rattenherzmuskelzellen

Inkubation von Rattenherzmuskelzellen wie in der Legende von Abb. 7 beschrieben.

Assoziation:

Dreiminütige Messung der $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart der in der Abszisse angegebenen K^+ -Konzentrationen.

$3,5 \cdot 10^6$ cpm/Fläschchen; 0,90 mg Protein/Fläschchen;
Inkubationsvolumen = 4,1 ml.

Dissoziation:

Inkubation der Zellen für 240 Minuten in Standard-Inkubationsmedium ($[\text{K}^+] = 0,75$ mM) und $8,7 \cdot 10^{-8}$ M $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin. Danach Messung der Dissoziation in Gegenwart der in der Abszisse angegebenen K^+ -Konzentrationen wie in der Legende von Abb. 7 beschrieben.

$3,7 \cdot 10^6$ cpm/Fläschchen; 0,80 mg Protein/Fläschchen;
Inkubationsvolumen = 4,1 ml.

Bestimmung der abdissoziierten $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin-Menge im Zeitraum von 5 min bis 12 h nach Beginn des Dissoziationsprozesses (Dissoziation von der hochaffinen Bindungsstelle; s. 3.1.3.2).

Bestimmung der unspezifischen Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M g-Strophanthin.

Die Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Doppel- bzw. Dreifachwerte. Bezüglich weiterer experimenteller Details siehe MATERIALIEN UND METHODEN.

dem Rattenherzmuskelzellen identischen Inkubationsbedingungen unterworfen wurden, sollte der Einfluß der Hitzedenaturierung auf die [^3H]-g-Strophanthin-Bindung in kultivierten Herzzellen untersucht werden.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, führt die Proteindenaturierung zu einer Reduktion der maximalen [^3H]-g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 9×10^{-8} M g-Strophanthin (Besetzung der hochaffinen Bindungsstelle zu 74 % und der niederaffinen Bindungsstelle zu 1 %; s. 3.1.3) auf Werte in Höhe der Bindung bei 10^{-3} M g-Strophanthin.

Um die Frage zu klären, ob sowohl die hoch- als auch die niederaffine g-Strophanthin-Bindungsstelle hitzeempfindlich ist, wurde die [^3H]-g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-6} M g-Strophanthin sowohl unter Kontrollbedingungen als auch bei Hitzedenaturierung gemessen. 10^{-6} M g-Strophanthin besetzt unter Gleichgewichtsbedingungen (s. 3.1.1) die hochaffine Bindungsstelle mit ca. 0,19 pmol/mg Protein und die niederaffine Bindungsstelle mit 0,32 pmol/mg Protein (s. 3.1.4.1). Bezieht man diese Werte auf 900 cpm/mg Protein spezifischer Bindung (s. Tab. 1), so sind etwa 335 cpm/mg Protein hochaffin und 565 cpm/mg Protein niederaffin gebunden. Durch Hitzedenaturierung läßt sich nun, wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, die Bindung - auch in Gegenwart von 10^{-6} M g-Strophanthin - auf die Höhe der unspezifischen Bindung reduzieren. Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß sowohl die hoch- als auch die niederaffine Bindungsstelle hitzesensibel ist. Ferner besteht eine gute Übereinstimmung zwischen der [^3H]-g-Strophanthin-Bindung an hitzedenaturierte Herzmuskelzellen und der Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M g-Strophanthin. Somit muß es sich bei der Herzglykosidbindung an hitzedenaturierte Herzmuskelzellen um unspezifische Bindungsvorgänge handeln (s. 2.4).

TABELLE 1: Einfluß von Hitzedenaturierung auf die [^3H]-g-Strophanthin-Bindung und ($^{86}\text{Rb}^+$ + K^+)-Aufnahme in kultivierten Rattenherzmuskelzellen

	Kontrolle	Hitzedenaturierung
<u>[^3H]-g-Strophanthin-Bindung</u>		
(cpm/mg Protein)		
9 · 10 ⁻⁸ M g-Strophanthin	4.050	678
10 ⁻⁶ M g-Strophanthin	1.807	614
10 ⁻³ M g-Strophanthin	908	769
<u>($^{86}\text{Rb}^+$ + K^+)-Aufnahmerate</u>		
(nmol/mg Protein · min)	17,6	0,1
<u>Zellprotein</u>		
(mg/Fläschchen)	1,0	0,81

Rattenherzmuskelzellen (Aussaatdichte: 90.000/cm²) wurden für 60 Minuten in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) bei 37 °C (Kontrolle) bzw. 60 °C (Hitzedenaturierung) inkubiert.

[^3H]-g-Strophanthin-Bindung: Anschließend Zugabe von [^3H]-g-Strophanthin (4,5 x 10⁶ cpm/Fläschchen) und g-Strophanthin in einer Endkonzentration von 9 x 10⁻⁸ M, 10⁻⁶ M bzw. 10⁻³ M und vierstündige Inkubation der Zellen in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) bei 37 °C. Bestimmung der [^3H]-g-Strophanthin-Bindung wie in METHODEN beschrieben.

($^{86}\text{Rb}^+$ + K^+)-Aufnahmerate: Nach der 60minütigen Vorinkubation bei 37 °C bzw. 60 °C wurden die Zellkulturen für weitere 240 Minuten bei 37 °C in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) inkubiert. Anschließend Zugabe von $^{86}\text{RbCl}$ -Lösung (2,8 x 10⁶ cpm/Fläschchen) und Ermittlung der Aufnahme über einen Zeitraum von 10 Minuten wie in METHODEN beschrieben.

Bezüglich weiterer experimenteller Details siehe MATERIALIEN UND METHODEN.

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte eng korrelierender Doppel- bzw. Dreifachwerte.

3.2 EINFLUSS VON g-STROPHANTHIN AUF DIE AKTIVITÄT DER ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase BZW. DIE GESCHWINDIGKEIT DES AKTI- VEN Na^+ - UND K^+ -TRANSPORTES

In den in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten wurde der Frage nachgegangen, ob die Besetzung der Strophanthin-Bindungsstellen zu einer Hemmung der Aktivität der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase - gemessen in Herzmuskelzellmembranen - und damit zu einer Hemmung des aktiven Na^+ - und K^+ -Transportes über die Zellmembran - gemessen in Herzmuskel- und Herzbindegewebszellen - führt.

3.2.1 Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität durch g-Stro- phanthin in Herzzellmembranen neonataler Ratten

In dem Experiment der Abb. 5 wurden Herzmuskelzellmembranen neonataler Ratten für 60 Minuten in Gegenwart unterschiedlicher Strophanthinkonzentrationen inkubiert. Im Anschluß daran wurde die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität als ATP-Spaltung mittels des gekoppelten optisch-enzymatischen Tests (166) gemessen.

Man erkennt eine zunehmende Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität durch steigende Strophanthinkonzentrationen, beginnend ab 5×10^{-6} M. Bei $4,8 \times 10^{-5}$ M g-Strophanthin ist nur noch 50 % der ursprünglichen ATPase-Aktivität meßbar. Ein Vergleich dieses IC_{50} -Wertes mit den beiden Dissoziationskonstanten der g-Strophanthin-Bindung ($K_{D1} = 2,2 \times 10^{-8}$ M, $K_{D2} = 1,3 \times 10^{-4}$ M; s. Abb. 6) zeigt, daß es durch Besetzung der hochaffinen Bindungsstelle noch zu keiner - mit der verwendeten Methodik erfassbaren - Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität kommt. Erst die Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle mit g-Strophanthin hemmt das Enzym.

3.2.2 Einfluß von g-Strophanthin auf den aktiven transmembranären ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-Transport in kultivierten Rattenherzzellen

3.2.2.1 Wirkung von g-Strophanthin auf die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme

Die aktive transmembranäre ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme in kultivierte Rattenherzzellen ist ein Maß für die Aktivität der Natriumpumpe (14, 185, 186). Zur Messung dieses ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Transportes wurden Rattenherzmuskelzellen und Rattenherzbindegewebszellen, unter völlig identischen Bedingungen wie zur Bestimmung der [^3H]-g-Strophanthin-Bindung (s. 3.1), in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) bei 37 °C in Gegenwart steigender g-Strophanthin-Konzentrationen (0 M - 10^{-2} M) für vier Stunden inkubiert (s. Abb. 11). Anschließend wurde über 10 Minuten die aktive transmembranäre Aufnahme von $^{86}\text{Rb}^+$ gemessen (s. 2.5).

In den Experimenten der Abb. 11 a und 11 b zeigt sich - neben der nur in einigen Versuchen nachweisbaren Stimulation in Gegenwart niedriger g-Strophanthin-Konzentrationen - reproduzierbar eine konzentrationsabhängige Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme durch g-Strophanthin sowohl in Rattenherzmuskelzellen als auch in Rattenherzbindegewebszellen. Durch 10^{-2} M g-Strophanthin kann mehr als 90 % der maximalen Enzymaktivität (gemessen in strophanthinfreiem Inkubationsmedium) gehemmt werden, woraus gefolgert werden kann, daß in Gegenwart von 0,75 mM K^+ mehr als 90 % des Kaliumeinstroms in die Zelle als Folge eines aktiven Transportprozesses der Natriumpumpe anzusehen ist. Die halbmaximale Hemmung der Natriumpumpe erfolgt in beiden Zellarten bei etwa $1,5 \times 10^{-5}$ M g-Strophanthin. Die Mittelwerte der IC_{50} -Werte mehrerer Experimente finden sich in Tabelle 2.

Durch Hitzedenaturierung der Rattenherzmuskelzellen (s. 3.1.5) läßt sich neben der spezifischen [^3H]-g-Strophanthin-Bindung auch die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme vollständig unterdrücken (s. Tab. 1).

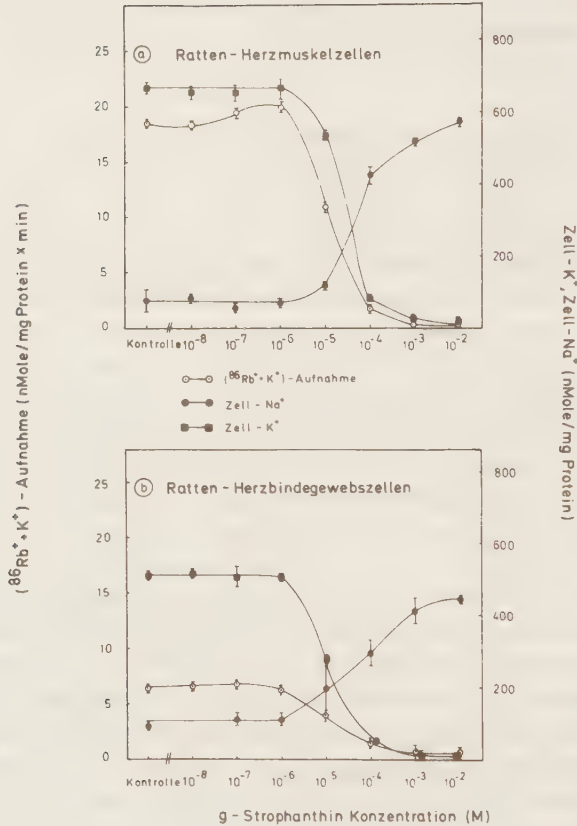


Abb. 11: Einfluß von g-Strophanthin auf die Aktivität der Natriumpumpe in kultivierten Rattenherzzellen.

Inkubation von Rattenherzmuskelzellen (Abb. 11 a) bzw. Rattenherzbindegewebszellen (Abb. 11 b) in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) bei 37 °C in Gegenwart der in der Abszisse angegebenen g-Strophanthin-Konzentrationen für vier Stunden. Bestimmung der aktiven $(^{86}\text{Rb} + \text{K}^+) \text{-Aufnahme}$ über zehn Minuten mit dem Tracer $^{86}\text{Rb}^+$ und Auftragung als nmol/mg Protein $\cdot$ min (s. 2.5). Messung des zellulären K^+ -Gehaltes (flammenphotometrisch) und Na^+ -Gehaltes (mit $^{22}\text{Na}^+$) in nmol/mg Protein wie in METHODEN (s. 2.6) beschrieben.

Fortsetzung Legende zu Abb. 11:

Abb. 11 a:

$2,02 \cdot 10^6$ cpm $^{86}\text{Rb}^+$ /Fläschchen; $8,98 \cdot 10^6$ cpm $^{22}\text{Na}^+$ /Fläschchen;
1,3 mg Protein/Fläschchen; Aussaatdichte = 80.000 Zellen/cm².

Abb. 11 b:

$2,75 \cdot 10^6$ cpm $^{86}\text{Rb}^+$ /Fläschchen; $10,72 \cdot 10^6$ cpm $^{22}\text{Na}^+$ /Fläschchen;
0,5 mg Protein/Fläschchen.

Bezüglich weiterer experimenteller Details siehe MATERIALIEN UND METHODEN.

Die für den zellulären K^+ -Gehalt angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM ($n = 4 - 16$); ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate und zellulärer Na^+ -Gehalt sind Mittelwerte $\pm$ SD ($n = 3$).

TABELLE 2: Eigenschaften der hoch- und niederaffinen g-Strophanthin-Bindungsstelle und des strophanthinsensitiven Kationentransportes in kultivierten Rattenherzzellen

	Muskelzellen	Bindegewebszellen
<u>Hochaffine Bindungsstelle</u>		
Dissoziationskonstante (K_D ; M)	$(3,2 \pm 2,0) \cdot 10^{-8}$	$\sim 10^{-8}$
g-Strophanthin-Bindungsstellen ($B_{\max}$; pmol/mg Protein)	$0,2 \pm 0,1$	$\sim 0,1$
<u>Niederaffine Bindungsstelle</u>		
Dissoziationskonstante (K_D ; M)	$(7,1 \pm 3,0) \cdot 10^{-6}$	$\sim 10^{-6}$
g-Strophanthin-Bindungsstellen ($B_{\max}$; pmol/mg Protein)	$2,6 \pm 0,6$	~ 1
IC_{50} der Hemmung der $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Aufnahme durch g-Strophanthin (M)	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$
IC_{50} der Senkung des zellulären K^+ -Gehaltes durch g-Strophanthin (M)	$(1,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(1,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$
IC_{50} der Zunahme des zellulären Na^+ -Gehaltes durch g-Strophanthin (M)	$10^{-5} - 10^{-4}$	$10^{-5} - 10^{-4}$

Die Tabelle stellt eine Zusammenfassung der Ergebnisse mehrerer Experimente, wie sie in den Abbildungen 6 und 11 gezeigt sind, dar. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM ($n = 4 - 8$).

3.2.2.2 Wirkung von g-Strophanthin auf den intrazellulären Na^+ - und K^+ -Gehalt

Zur Erfassung der Auswirkung der Hemmung des aktiven Kationentransportes wurde in jedem Experiment auch der intrazelluläre Natriumgehalt (gemessen mit $^{22}\text{Na}^+$; s. 2.6) und der intrazelluläre Kaliumgehalt (flammenphotometrische Messung; s. 2.6) unter g-Strophanthin-Einfluß bestimmt. In Abb. 11 a und 11 b erkennt man - parallel zur Hemmung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme - einen Abfall des zellulären Kaliumgehalts und einen Anstieg des zellulären Natriumgehalts sowohl in Rattenherzmuskelzellen als auch in Rattenherzbindegewebszellen. In Tabelle 2 finden sich die Mittelwerte der IC_{50} -Werte mehrerer Experimente für die g-Strophanthin-induzierte Abnahme des Zell-Kalium und Zunahme des Zell-Natrium. Eine 50prozentige Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase - gemessen über den $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Influx - in kultivierten Rattenherzzellen führt auch zu einer ca. 50prozentigen Abnahme des intrazellulären Kalium und 50prozentigen Zunahme des intrazellulären Natrium.

3.3 KORRELATION VON g-STROPHANTHIN-BINDUNG, HEMMUNG DER $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -AUFNAHME UND INTRAZELLULÄREM K^+ -GEHALT IN KULTIVIERTEN RATTENHERZZELLEN

Ein Vergleich der IC_{50} -Werte der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme ($1,3 \times 10^{-5}$ M in Muskelzellen; $1,5 \times 10^{-5}$ M in Bindegewebszellen; s. Tab. 2) mit den Dissoziationskonstanten der spezifischen g-Strophanthin-Bindung ($\text{K}_{\text{D}1} = 3,2 \times 10^{-8}$ M; $\text{K}_{\text{D}2} = 7,1 \times 10^{-6}$ M; s. Tab. 2) kultivierter Rattenherzzellen zeigt eine enge Beziehung zwischen der Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle und der Hemmung der Natriumpumpe.

Zur weiteren Abklärung dieser unter Gleichgewichtsbedingungen erhobenen Befunde wurde im Experiment der Abb. 12 der Zusammenhang von g-Strophanthin-Bindung und Hemmung der Natriumpumpe unter kinetischen Meßbedingungen untersucht.

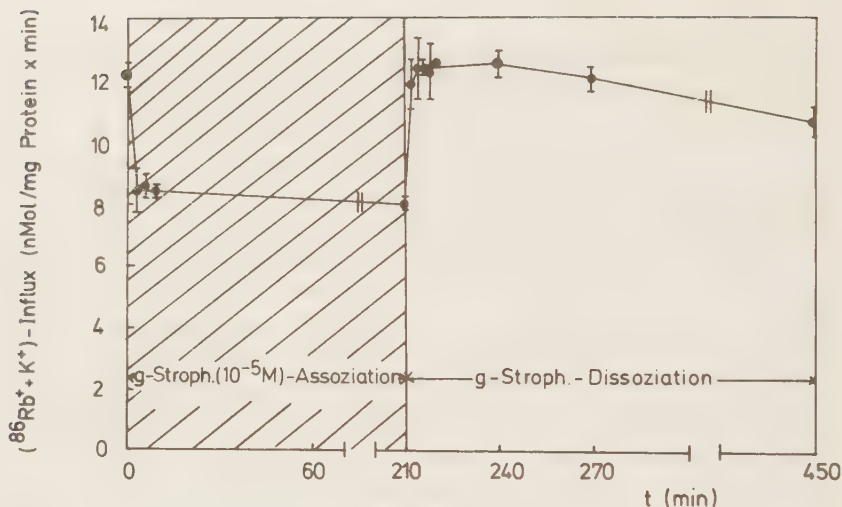


Abb. 12: Kinetik der g-Strophanthin-induzierten Hemmung und Reaktivierung der (⁸⁶Rb⁺ + K⁺)-Aufnahme in kultivierten Rattenherzmuskelzellen

Inkubation von Rattenherzmuskelzellen (25 cm² Kulturfläschchen) bei 37 °C in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) ohne (Assoziation) bzw. mit (Dissoziation) 10⁻⁵ M g-Strophanthin für 210 Minuten.

a) Assoziation:

Danach Inkubation der Zellen in 10⁻⁵ M g-Strophanthin-haltigem Medium für die in der Abszisse angegebenen Zeiten.

b) Dissoziation:

Spülung des Zellrasens mit 5 x 5 ml g-Strophanthin-freiem Inkubationsmedium und Inkubation für 450 Minuten in 4 ml Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2).

Bestimmung der (⁸⁶Rb⁺ + K⁺)-Aufnahme über eine Minute mit dem Tracer ⁸⁶Rb⁺ zu den in der Abszisse angegebenen Zeiten (siehe METHODEN, 2.5).

Die angegebenen Daten sind Mittelwerte ± SD eng korrelierender Dreifachwerte.

Bezüglich weiterer experimenteller Details siehe MATERIALIEN UND METHODEN.

Dazu wurden Rattenherzmuskelzellen bei 37 °C in Gegenwart von 10^{-5} M g-Strophanthin (Besetzung der hochaffinen Bindungsstelle zu über 99 % und der niederaffinen Bindungsstelle zu ca. 59 %; s. 3.1.3) in Standard-Inkubationsmedium (s. 2.2) für 210 Minuten inkubiert. Daran anschließend erfolgte die Dissoziation von g-Strophanthin über einen Zeitraum von 450 Minuten. Sowohl während der Assoziations- als auch während der Dissoziationsphase wurde die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate zu den in der Abszisse von Abb. 12 angegebenen Zeiten bestimmt.

Innerhalb der ersten drei Minuten der Inkubation in 10^{-5} M g-Strophanthin nimmt die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate von 12,2 pmol/mg Protein x min auf 8,4 pmol/mg Protein x min ab, wobei dieser Wert während der gesamten dreieinhalbstündigen Inkubation dann konstant bleibt. Die Hemmung der Natriumpumpe durch 10^{-5} M g-Strophanthin war dann innerhalb der ersten vier Minuten der Auswaschphase wieder völlig reversibel. Dieser Wert korreliert gut mit der "raschen Phase" der Dissoziation von [^3H]-g-Strophanthin (s. Abb. 7 b und 7 d und 3.1.3.2). Dies bedeutet, daß in kultivierten Rattenherzmuskelzellen - unter kinetischen Meßbedingungen - die Besetzung der niederaffinen Herzglykosidbindungsstelle mit der Hemmung der Natriumpumpe gut korreliert.

Um der Frage der quantitativen Korrelation von g-Strophanthin-Bindung und Hemmung der Natriumpumpe in intakten kultivierten Rattenherzmuskelzellen weiter nachzugehen, wurden in ein und demselben Experiment sowohl die spezifische [^3H]-g-Strophanthin-Bindung, als auch die Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme unter Gleichgewichtsbedingungen bestimmt (s. Abb. 13). Dazu wurde mit einem Teil der Kulturfläschchen eine konzentrationsabhängige Bindung von [^3H]-g-Strophanthin - wie in 3.1.2 beschrieben - durchgeführt. Bei der Auftragung nach Scatchard (163) ergab sich im Experiment der Abb. 13 für die hochaffine Bindungsstelle eine Dissoziationskonstante K_{D1} von $1,1 \times 10^{-8}$ M und eine Bindungskapazität $B_{\text{max}1}$ von 0,1 pmol/mg Protein und für die niederaffine Bindungsstelle eine Dissoziationskonstante

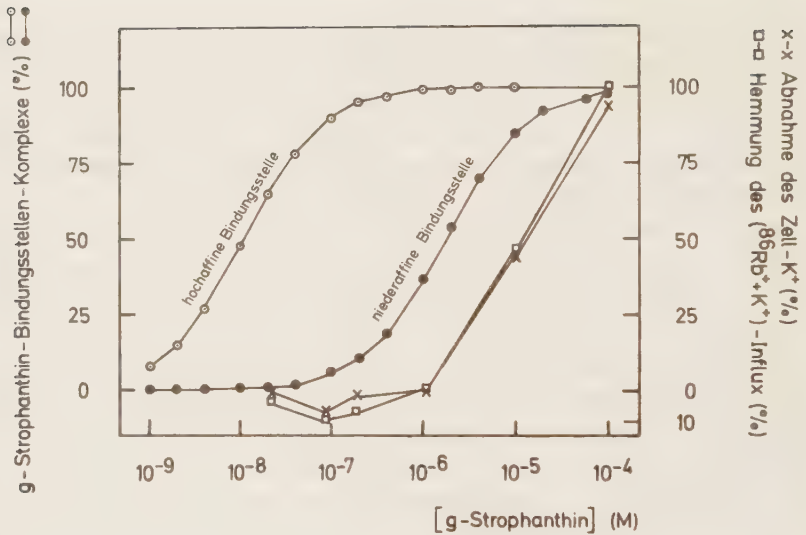


Abb. 13: Korrelation von g-Strophanthin-Bindung, Hemmung der Natriumpumpe und Abnahme des intrazellulären K^+ -Gehaltes in kultivierten Rattenherzmuskelzellen.

Bestimmung der spezifischen $[^3H]$ -g-Strophanthin-Bindung, der Hemmung des $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Influx und der Abnahme des zellulären Kaliums, wie in den Legendenden der Abb. 4 bzw. 11 beschrieben.

Bezüglich der rechnerischen Ermittlung der prozentualen Bindungsstellenbesetzung und der prozentualen Hemmung des $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Influx bzw. der Abnahme des Zellkalium sei auf den Abschnitt 3.3 verwiesen.

Analyse der Bindungsdaten nach Scatchard (163):

$$K_{D1} = 1,1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

$$K_{D2} = 1,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$B_{\max 1} = 0,1 \text{ pmol/mg Protein}$$

$$B_{\max 2} = 2,0 \text{ pmol/mg Protein}$$

$$3,4 \cdot 10^6 \text{ cpm } [^3H]\text{-g-Strophanthin/Fläschchen;}$$

$$1,8 \cdot 10^6 \text{ cpm } ^{86}Rb^+/\text{Fläschchen; Inkubationsvolumen} = 4,1 \text{ ml;}$$

$$0,7 \text{ mg Protein/Fläschchen; Aussaatdichte} = 65.000 \text{ Zellen/cm}^2.$$

Kontrollwerte:

$$\begin{aligned} (^{86}Rb^+ + K^+)\text{-Aufnahmerate} &= 8,6 \text{ nmol/mg Protein} \cdot \text{min} \\ \text{Zell-}K^+ &= 400 \text{ nmol/mg Protein} \end{aligned}$$

Werte bei $10^{-2} \text{ M g-Strophanthin}$:

$$\begin{aligned} (^{86}Rb^+ + K^+)\text{-Aufnahmerate} &= 0,01 \text{ nmol/mg Protein} \cdot \text{min} \\ \text{Zell-}K^+ &= 10 \text{ nmol/mg Protein} \end{aligned}$$

Bezüglich weiterer experimenteller Details siehe MATERIALIEN UND METHODEN.

K_{D2} von $1,7 \times 10^{-6}$ M und eine Bindungskapazität $B_{\max 2}$ von 2,0 pmol/mg Protein.

Um die [^3H]-g-Strophanthin-Bindung quantitativ mit der Hemmung des aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Transportes korrelieren zu können, mußte zunächst das Ausmaß der Besetzung der hoch- bzw. nieder-affinen g-Strophanthin-Bindungsstelle für verschiedene g-Strophanthin-Konzentrationen ermittelt werden. Bei Kenntnis von K_D und $B_{\max}$ der jeweiligen Bindungsstelle ist dies über das Massenwirkungsgesetz möglich (s. Gleichung (3), 3.1.3). In Abb. 13 wurde die Konzentration an g-Strophanthin-Bindungsstellen-Komplexen in Prozent der maximalen g-Strophanthin-Bindungskapazität ($B_{\max}$ der jeweiligen Bindungsstelle) angegeben.

Neben der spezifischen g-Strophanthin-Bindung wurde in dem Experiment auch noch die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme - als Maß der Aktivität der Natriumpumpe - und der intrazelluläre K^+ -Gehalt in Abhängigkeit von der g-Strophanthin-Konzentration ($0 \text{ M} - 10^{-2} \text{ M}$), wie in 3.2.2 beschrieben, gemessen. Setzt man die Differenz des Kontrollwertes der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme bzw. des intrazellulären K^+ -Gehaltes in Gegenwart von 0 M g-Strophanthin und des Wertes in Gegenwart von 10^{-2} M g-Strophanthin gleich 100 %, so läßt sich für jede g-Strophanthin-Konzentration das Ausmaß der Hemmung in Prozent ausdrücken (s. Abb. 13).

Aus Abb. 13 ist ersichtlich, daß die Besetzung der hochaffinen Bindungsstelle in Rattenherzmuskelzellen weder zu einer Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme, noch zu einer Abnahme des intrazellulären K^+ -Gehaltes führt. Dagegen resultiert die Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle in einer g-Strophanthin-induzierten Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme und Abnahme des intrazellulären Kaliums im gleichen Konzentrationsbereich. Allerdings müssen etwa 30 % der niederaffinen Bindungsstellen mit g-Strophanthin abgesättigt sein, bevor es zu einer, mit der verwendeten Methodik erfaßbaren Hemmung des transmembranären Kationentransportes kommt.

3.4 BEEINFLUSSUNG DER PULSATIONSAMPLITUDE UND KONTRAKTIONSGESCHWINDIGKEIT KULTIVierter RATTENHERZMUSKELZELLEN DURCH g-STROPHANTHIN

In kultivierten Rattenherzmuskelzellen kann als Maß für die herzoglykosidbedingte Steigerung der Kontraktionskraft die Zunahme der Pulsationsamplitude und der Kontraktionsgeschwindigkeit der Zelle verwendet werden (94, 164).

Mit der im Abschnitt 2.8 beschriebenen Meßanordnung wurde in kultivierten Rattenherzmuskelzellen der Einfluß von g-Strophanthin auf die oben erwähnten Kontraktionsparameter elektrisch stimulierter (100/min) Rattenherzmuskelzellen untersucht. Das Ausmaß der Zunahme der Kontraktionsamplitude, ausgedrückt in Prozent des Kontrollwertes (= 100 %), wurde gegen die eingesetzte g-Strophanthin-Konzentration aufgetragen. Auf diese Weise wurde die in Abb. 15 dargestellte Dosiswirkungskurve erhalten.

In kultivierten Rattenherzmuskelzellen zeigt g-Strophanthin bei Konzentrationen von 5×10^{-6} M, 10^{-5} M und 5×10^{-5} M konzentrationsabhängige Effekte auf die Kontraktionsgeschwindigkeit. 10^{-6} M g-Strophanthin bleibt - bei den gewählten Versuchsbedingungen - ohne Einfluß, und höhere Konzentrationen als 5×10^{-5} M führen zu Arrhythmien (s. Abb. 15). In Abb. 14 erkennt man, daß die maximale Amplitudenzunahme durch die jeweilige g-Strophanthin-Konzentration mit einer Halbwertszeit von zwei bis drei Minuten erfolgt. Diese Effekte sind bei Perfusion mit strophanthinfreiem Medium mit einer Halbwertszeit von zwei bis vier Minuten wieder reversibel.

Die Halbwertszeit der Reversibilität der g-Strophanthin-Wirkung korreliert mit der "raschen Phase" der Dissoziation des Herzglykosids von seiner Bindungsstelle (s. 3.1.3.2) und die wirk-samen Konzentrationen liegen im gleichen Bereich wie die Dissoziationskonstante der niederaffinen Bindungsstelle (s. Tab.

2). Aus diesen Ergebnissen kann daher gefolgert werden, daß die Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle in kultivierten Rattenherzmuskelzellen mit einer Steigerung der Pulsationsamplitude und Kontraktionsgeschwindigkeit einhergeht, während bei Absättigung der hochaffinen Bindungsstelle keine derartigen Effekte erfaßbar waren.

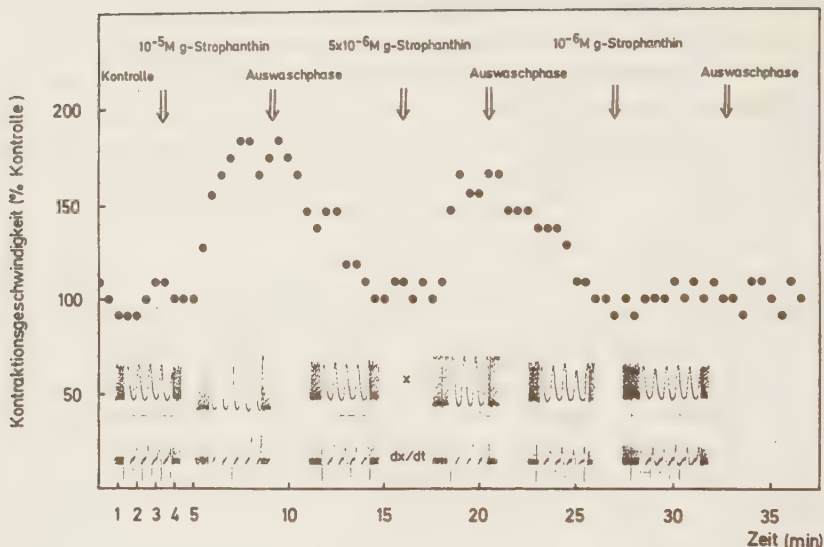


Abb. 14: Einfluß von g-Strophanthin auf die Kontraktionsamplitude (x) und Kontraktionsgeschwindigkeit (dx/dt) elektrisch stimulierter Rattenherzmuskelzellen in Kultur.

Deckgläschen mit Rattenherzmuskelzellen (Aussaatdichte = 100.000 Zellen/cm²) wurden in die Perfusionskammer (s. Abb. 2) eingelegt und mit Perfusionsmedium (CMRL-1415-ATM-Medium, 0,8 mM Ca²⁺, 1,5 mM K⁺, 20 mM Hepes, pH = 7,40) ohne (Kontrolle bzw. Auswaschphase) oder mit g-Strophanthin (10⁻⁶ M - 10⁻⁵ M) bei 37 °C, wie in METHODEN beschrieben, perfundiert.

Stimulation der Zellen mit einer Frequenz von 100/min (angelegte Spannung = 100 V; Reizdauer = 10 msec).

Messung der Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit alle 30 sec und Auftragung als Prozentsatz des Kontrollwertes (= 100 %).

Bezüglich weiterer experimenteller Details siehe METHODEN, 2.8.

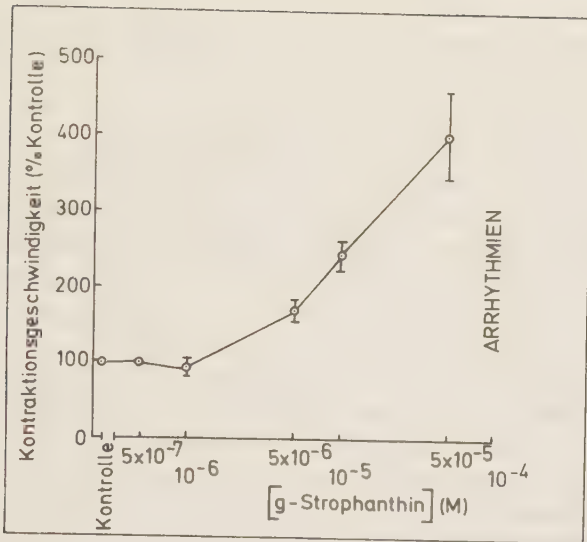


Abb. 15: Einfluß von g-Strophanthin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit kultivierter Rattenherzmuskelzellen.

Mit Rattenherzmuskelzellen bewachsene Deckgläschen wurden mit Perfusionsmedium (CMRL-1415-ATM, 0,3 mM CaCl_2 , 1,5 mM KCl, 20 mM Hepes, pH = 7,40), wie in 2.8 und der Legende zu Abb. 14 beschrieben, perfundiert.

Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 100/min (angelegte Spannung = 100 V; Reizdauer = 10 msec) stimuliert und die Pulsationsamplitude und Kontraktionsgeschwindigkeit alle 30 sec gemessen.

Für jede g-Strophanthin-Konzentration (siehe Abszisse) wurde ein Deckgläschen verwendet. Nachdem die durch die jeweilige g-Strophanthin-Konzentration erreichte Amplitudenzunahme maximal war, erfolgte die Überprüfung der Reversibilität des Effektes durch Perfusion mit strophanthinfreiem Medium für fünf Minuten.

Die in der Abbildung gezeigten Daten entsprechen dem durch die jeweilige g-Strophanthin-Konzentration erreichbaren maximalen Effekt und sind als Mittelwerte $\pm$ SEM ($n = 3 - 10$) angegeben. Der Kontrollwert ohne g-Strophanthin-Zusatz wird gleich 100 % angesetzt. Bei g-Strophanthin-Konzentrationen $> 5 \cdot 10^{-5}$ M treten Arrhythmien auf.

Bezüglich weiterer experimenteller Details siehe MATERIALIEN UND METHODEN.

Digitalisglykoside wirken am Herzmuskel positiv inotrop (28, 170). Trotz intensiven experimentellen Bemühens herrscht jedoch auch heutzutage noch keine völlige Einigkeit über ihren Wirkungsmechanismus (140). Als gesichert kann gelten, daß Herzglykoside spezifisch an die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase (EC 3.6.1.3) an der Außenseite eukaryonter Zellen binden; andere Rezeptoren waren bisher nicht nachweisbar (54). Der Effekt dieser Pharmakon-Rezeptor-Interaktion auf die Enzymaktivität im Bereich niedriger, klinisch-therapeutisch relevanter, positiv inotrop wirksamer Dosen wird allerdings kontrovers beurteilt (140). Die zentrale Frage lautet: Ist die Hemmung der Natriumpumpe mit konsekutiv vermindertem transmembranärem Natrium- und Kaliumgradienten notwendige Voraussetzung einer myokardialen Kontraktionskraftzunahme?

Die von Langer als "sodium pump lag" bezeichnete Auffassung (112), die früher bereits u. a. von Repke (155, 157) vertreten wurde, bejaht diese Frage. Danach führt eine partielle Hemmung der Natriumpumpe durch Herzglykoside über eine erhöhte zelluläre Natriumkonzentration mit konsekutiv vermehrtem Ca^{2+} -Einstrom ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Gegenaustausch) zu einer verstärkten Aktivierung kontraktiler Proteine und zum positiv inotropen Effekt (111, 112). Elektrophysiologische Untersuchungen mit ionensensitiven Mikroelektroden (40, 116, 117, 182) sowie Messungen transmembranärer Ionenflüsse mit Isotopen (13, 17) stützen diese Vorstellung experimentell. Besonders in digitalissensitiven Spezies wie Mensch, Rind, Hund oder Katze ist eine exakte quantitative Korrelation von Glykosidbindung und Enzymhemmung (im Verhältnis 1 : 1) nachweisbar, d. h., wenn ein Molekül g-Strophanthin gebunden wird, dann kommt es auch zur Hemmung von einem $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Molekül (6, 54, 170).

Diese Befunde schließen jedoch andere, eventuell zusätzlich existente Wirkungsmechanismen kardioaktiver Steroide nicht aus.

So konnten einige Arbeitsgruppen positiv inotrope Effekte ohne Natriumpumpenhemmung messen (137, 144, 147, 179). Niedrige Digitaliskonzentrationen vermögen die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität von Membranpräparationen nicht nur zu hemmen (136, 170), sondern auch zu stimulieren (32, 147). Auch in isolierten Herzmuskelpräparaten fand sich sowohl eine Stimulation als auch keinerlei Beeinflussung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme - einem Maß der Natriumpumpenaktivität - durch positiv inotrop wirksame Digitalisdosen (52, 53, 72).

Bei der vergleichenden Interpretation der zum Teil widersprüchlichen experimentellen Resultate muß stets mitberücksichtigt werden, daß unterschiedlich sensitive Methoden zur Bestimmung der Aktivität der Natriumpumpe Verwendung fanden, wie die Messung der Enzymaktivität (6, 54, 170), transmembranäre Ionenflußmessungen mit $^{42}\text{K}^+$ oder $^{86}\text{Rb}^+$ (72), Bestimmung zellulärer Kationengehalte (139) sowie Messung der intrazellulären Natriumaktivität (116, 117, 182); so ist es denkbar, daß z. B. sehr geringe oder zyklisch auftretende zelluläre Kationenkonzentrationsänderungen mit relativ unempfindlichen Meßmethoden nicht erfaßt werden können.

Im Jahre 1980 wurde dann erstmalig über - in der Folgezeit bestätigte - Experimente berichtet, die eine zumindest teilweise Erklärung der einander widersprechenden Befunde liefern könnten: das Rattenherz besitzt zwei funktionell unterschiedliche Herzglykosidrezeptoren (52).

Strophanthin bindet in mit $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ angereicherten Membranpräparationen des Rattenherzens an eine hochaffine Bindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten K_D von $1 - 2,3 \times 10^{-7} \text{ M}$ (52), $1,9 - 2,1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (61, 62, 141) bzw. $4 \times 10^{-8} \text{ M}$ (88). Diese hochaffine Bindung konnte auch im isolierten Muskelpräparat aus dem rechten Ventrikel nachgewiesen werden ($K_D = 3 \times 10^{-7} \text{ M}$; 52); hier führt sie zu einem positiv inotropen Effekt ($\text{EC}_{50} = 3 - 5 \times 10^{-7} \text{ M}$; 2, 52, 77, 78). Während etwa 10 %

aller Bindungsstellen g-Strophanthin mit hoher Affinität binden (52, 61), besitzen die restlichen 90 % der Digitalisbindungsstellen eine K_D von $2,8 \times 10^{-5}$ M (52) bzw. $1,3 - 1,4 \times 10^{-5}$ M (61, 62, 141) und führen zu einer Hemmung der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase-Aktivität in Enzympräparationen ($IC_{50} = 4 - 6,5 \times 10^{-5}$ M; 2, 52, 88) bzw. der aktiven $^{86}Rb^+$ -Aufnahme in isolierten Muskelpräparaten ($IC_{50} = 3 \times 10^{-5}$ M; 52). Die Besetzung dieser niederaffinen Bindungsstellen korreliert ebenfalls mit einem positiv inotropen Effekt im isolierten Muskelstreifen aus dem rechten Ventrikel adulter Ratten ($EC_{50} = 1 - 4,5 \times 10^{-5}$ M; 2, 77, 78). Auch im Langendorff-Präparat des Rattenherzens (103, 104), nicht jedoch im isolierten Muskelpräparat des linken Vorhofs (2, 61, 62, 77) findet sich dieser biphasische positiv inotrope Effekt (2, 61, 62, 77, 78, 88). Eine Steigerung der Kontraktionskraft im rechten Ventrikel adulter Ratten ist also sowohl im Konzentrationsbereich der hoch- als auch der niederaffinen Herzglykosidbindungsstelle meßbar, während toxische Effekte (Arrhythmien, Kontrakturen) stets nur der Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle zuzuordnen waren (52). Ob auch die hochaffine Bindungsstelle mit einer Hemmung der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase-Aktivität verknüpft sein kann, darüber herrscht noch keine völlig Klarheit. Neuere Untersuchungen scheinen dies zu belegen (61, 62, 79, 127, 128).

Im Rattenherzen (isoliertes Muskelpräparat, Langendorff-Präparat, Membranhomogenate) sind also funktionell unterschiedliche Herzglykosidrezeptoren nachgewiesen - die Besetzung des hochaffinen Rezeptors führt nur zu einer Steigerung der Kontraktionskraft und die des niederaffinen Rezeptors sowohl zu positiv inotropen als auch zu toxischen Effekten (2, 52). Die Spezies Ratte gilt allerdings als relativ digitalisinsensitiv bezüglich der Hemmung der kardialen $(Na^+ + K^+)$ -ATPase (52, 149) und besitzt überdies im Hirngewebe hochaffinere Glykosidbindungsstellen als im Myokard (59, 149), so daß Überdosierungserscheinungen primär zu zerebralen und weniger zu kardialen Symptomen führen. Es stellt sich somit die Frage, ob der Nach-

weis zweier Herzglykosidbindungsstellen auch in anderen Organen oder Spezies gelingt, oder ob die Ratte eine Sonderstellung einnimmt.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten auch im Meerschweinchenherzen hoch- und niederaffine Herzglykosidrezeptoren unterscheiden; hier ist gleichfalls ein positiv inotroper Effekt ohne eine Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes möglich (19, 21, 51, 57, 65, 66, 69, 71). Nun gilt auch das Meerschweinchen, ebenso wie die Ratte, als relativ digitalisinsensitiv (19). Aus diesen Befunden wurde gefolgert, daß das Zwei-Rezeptor-System eine Eigenschaft digitalisinsensitiver Spezies sein könnte, während in herzglykosidempfindlichen Arten, wie z. B. der Katze, eine quantitative 1 : 1-Korrelation von Glykosidbindung, Hemmung des Na^+/K^+ -Transportes und positiver Inotropie nachweisbar ist (53). Angesichts der Existenz von zwei Bindungsstellen in Enzympräparationen aus Humanherz (36) - zumindest unter bestimmten Inkubationsbedingungen (Gegenwart von Kalium; 20, 21, 59) - bzw. im Hundemyokard (184), also bei Spezies, die als digitalissensitiv gelten, läßt sich obige Vorstellung nicht mehr uneingeschränkt aufrechterhalten. Unterschiedliche Glykosidbindungsstellen sind weiterhin nicht nur eine Eigenschaft des Organs Herz, sondern finden sich u. a. auch in Membranpräparationen aus der Niere des Hundes (90), des Hirngewebes von Rindern (81, 178) und Ratten (30, 59) sowie in Fettzellen (63) und Zellen renalen Ursprungs (176).

Kritisch einschränkend muß allerdings angemerkt werden, daß der Nachweis unterschiedlicher Herzglykosidbindungsstellen des Herzens entweder in Membranhomogenaten oder in isolierten Muskelpräparaten gelang, also in experimentellen Modellen, in denen eine Interpretation der erhaltenen Resultate erschwert ist (Heterogenität des Myokardgewebes, großer Interzellulärraum, nervales Gewebe etc.; s. EINLEITUNG).

Angesichts der großen klinisch-pharmakologischen und therapeutischen Relevanz des Befundes funktionell unterschiedlicher

Herzglykosidrezeptoren - mit einer möglich erscheinenden Trennung zwischen positiv inotropen und toxischen Glykosideffekten - und angesichts der Vorteile des "Systems Zellkultur" (s. EINLEITUNG), wurde in der intakten kultivierten Herzmuskelzelle neonataler Ratten der Frage der Existenz verschiedener Herzglykosidbindungsstellen bzw. -rezeptoren nachgegangen.

4.1 EXISTIEREN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE HERZGLYKOSIDBINDUNGSSTELLEN IN KULTIVierten RATTENHERZZELLEN?

Die Herzglykosid-Bindungsstellen-Interaktion ist an mit $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase angereicherten Membranpräparationen diverser Gewebe und Spezies ausführlich charakterisiert. Spezifische Bindungsstellen sollten danach selektiv für Herzglykoside sein und der sättigbare und reversible Bindungsvorgang sollte mit hoher Affinität erfolgen (54). Diese Kriterien lassen sich in ebenso quantitativer Art und Weise auch auf intakte Herzzellen anwenden (197). In kultivierten Hühnerherzzellen ist unter Zugrundelegung dieser Maßstäbe eine einheitliche Klasse von Herzglykosidrezeptoren charakterisiert (188, 197).

Die Herzglykosidbindung an myokardiale Zellen neonataler Ratten, die sich gut in Zellkultur als Monolayer züchten lassen, wurde unter völlig identischen experimentellen Bedingungen, wie für Hühnerherzzellen beschrieben (188), untersucht (190):

Das Herzglykosid g-Strophanthin bindet spezifisch, sättigbar und reversibel sowohl an die Rattenherzmuskel- als auch an die Rattenherzbindegewebszelle (s. 3.1.1; 3.1.3.2; Abb. 3, 7 b, 7 d). Der Assoziationsvorgang ist mit einer Reaktionskinetik 2. Ordnung vereinbar (s. 3.1.3.1; Abb. 7 a, 7 c). Die Auftragung der Daten der konzentrationsabhängigen $[^3\text{H}]$ -g-Strophanthin-Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen nach Scatchard (163) ergibt regelmäßig einen gekrümmten Kurvenverlauf sowohl in Muskel- als auch in Bindegewebszellen des neonatalen Ratten-

herzens (s. 3.1.2; Abb. 4 b). Dieser Befund kann für das Vorliegen unterschiedlicher Bindungsstellen sprechen (Übersicht bei 54). Unter dieser Annahme läßt sich eine sättigbare hochaffine ($K_D = 3,2 \times 10^{-7} \text{ M}$) von einer sättigbaren niederaffinen Bindungsstelle ($K_D = 7,1 \times 10^{-6} \text{ M}$) unterscheiden (s. Tab. 2). Von der Gesamtzahl von ca. $1,1 \times 10^6$ Bindungsstellen pro Rattenherzmuskelzelle binden etwa 7 % Herzglykoside mit hoher und 93 % mit niederer Affinität (s. 3.1.2; Tab. 2).

Nicht nur die Existenz von mindestens zwei verschiedenen Bindungsproteinen mit unterschiedlichen Bindungskapazitäten kann einen gekrümmten Kurvenverlauf in der Scatchard-Auftragung erklären. Weitere Ursachen - speziell in Membranpräparationen - sind beispielsweise: das Vorhandensein mehrerer Subpopulationen von untereinander unabhängigen Rezeptoren; negative Kooperativität innerhalb einer oder auch mehrerer Rezeptorpopulationen; unterschiedliche Bindungsaffinität gegenüber radioaktiv markierten und nicht markierten Liganden; ungenaue Bestimmung der freien Pharmakonzentration; unspezifische Interaktion oder Instabilität des Rezeptors (Übersicht bei 49, 54).

Bei der kritischen Analyse eines gekrümmten Kurvenverlaufs von - nach Scatchard aufgetragenen - Bindungsdaten kultivierter Herzzellen, müssen besonders nachfolgend aufgeführte Erklärungsmöglichkeiten berücksichtigt werden:

- 1) Ein Teil des spezifisch gebundenen g-Strophanthins könnte via Diffusion oder über spezifische Transportprozesse in die Zelle aufgenommen worden sein.

Eine derartige "Internalisierung" von g-Strophanthin mit nachfolgender Speicherung in Lysosomen haben verschiedene Arbeitsgruppen in intakten kultivierten HeLa-Zellen nachgewiesen (31, 106, 151, 194).

Der Aufnahme-prozeß in diese Zellen läßt sich folgendermaßen charakterisieren:

- a) Die zeitabhängige Bindung verläuft biphasisch und zeigt auch nach 50 Stunden noch keine Sättigung (31).
- b) Mit Halbwertszeiten von 20 - 70 Stunden erfolgt die Freisetzung von zellgebundenem [^3H]-g-Strophanthin sehr langsam im Vergleich zu der Glykosiddissoziation von mit $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase angereicherten Zellmembranpräparationen (31, 106).
- c) Blockiert man die Natriumpumpe durch zehnminütige Applikation von g-Strophanthin und inkubiert man die Zellen anschließend in glykosidfreiem Medium, so wird bereits nach drei Stunden wieder ein normaler K^+ -Influx - als Parameter der Aktivität der Natriumpumpe - gemessen, während über 24 Stunden noch "zellgebundenes" [^3H]-g-Strophanthin nachweisbar ist (106).

In kultivierten Rattenherzzellen zeigt die spezifische zeitabhängige Bindung - anders als in HeLa-Zellen - keine lineare Zunahme, sondern eine Sättigungskinetik (s. 3.1.1; Abb. 3). Es könnte allerdings auch ein sättigbarer Carrier-vermittelter transmembranärer Herzglykosidtransport vorliegen, der allerdings bisher lediglich in Hepatozyten und nicht in Kardiozyten nachweisbar war und der kaliumunabhängig ist (171). Neben der Sättigbarkeit der spezifischen [^3H]-g-Strophanthin-Bindung (s. Abb. 3) und deren K^+ -Abhängigkeit sowohl im hoch- als auch im niederaffinen Konzentrationsbereich (s. 3.1.4; Abb. 9) spricht besonders der Nachweis von zwei Herzglykosidbindungsstellen in Zellmembranhomogenaten des neonatalen Rattenherzens - also bei aufgehobener Zellintegrität ohne definierten Intra- bzw. Extrazellulärraum - gegen eine intrazelluläre Aufnahme und Speicherung kardioaktiver Steroide (s. Abb. 6). Ferner wurde bei allen Experimenten mit Herzzellen als Herzglykosid das hydrophile g-Strophanthin verwendet, dessen intrazelluläre Aufnahme aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften sehr gering ist (87).

Die Internalisierung von spezifisch gebundenem [^3H]-g-Strophanthin kann also somit als äußerst unwahrscheinlich gelten. Andererseits ist es jedoch möglich, daß ein Teil der unspezifischen, nicht-sättigbaren Strophanthin-Bindung (s. Abb. 3) in Gegenwart sehr hoher Glykosidkonzentrationen (10^{-4} M - 10^{-2} M) internalisiertes Strophanthin darstellt. Da zur Ermittlung der spezifischen Bindung jeweils die unspezifische Bindung von der Gesamtbindung subtrahiert wurde (s. 2.4), würde ein derartiger Befund die Messung der Herzglykosidbindung an die hoch- bzw. niederaffine Bindungsstelle nicht beeinflussen.

- 2) Bei der Bindung von g-Strophanthin an seine zelluläre Bindungsstelle könnte es sich auch um einen kooperativen Prozeß handeln. Darunter versteht man, daß die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor die Bindung eines weiteren Moleküls erleichtert (positive Kooperativität) oder - im Falle negativer Kooperativität - erschwert (34). Ein gekrümmter Kurvenverlauf im Scatchard Plot wäre auch durch das Vorhandensein einer negativen Kooperativität erklärbar; mit zunehmender g-Strophanthin-Bindung würde die Affinität der Bindungsstelle zum Liganden abnehmen (33, 34, 122, 123).

Eine Möglichkeit, negative Kooperativität unter Rezeptoren nachzuweisen, besteht darin, die Dissoziation eines Liganden-Rezeptor-Komplexes mit dem Dissoziationsvorgang in Gegenwart einer großen Menge von nicht radioaktiv markiertem Liganden zu vergleichen. Im letzteren Fall sind durch die hohe Ligandenkonzentration ständig sämtliche Bindungsstellen besetzt, so daß die Abdissoziation des radioaktiv markierten Liganden quantitativ ohne Einfluß auf die Rezeptor-Besetzung bleibt. Im Falle einer negativen Kooperativität sollten bei der Abdissoziation des Liganden von seinem Rezeptor (gemäß der unterschiedlichen Rezeptoraffinität bei unterschiedlicher Rezeptorbesetzung) verschiedene Dissoziationsraten bei hoher und niedriger Rezeptorbesetzung meßbar sein (33, 34).

In kultivierten Herzzellen neonataler Ratten ist im Dissoziationsexperiment kein Hinweis auf das Vorliegen einer negativen Kooperativität zu finden (s. 3.1.3.2). Diese mögliche und diskutierte Bindungsstelleneigenschaft vermag den gekrümmten Kurvenverlauf im Scatchard Plot folglich nicht zu erklären.

- 3) Primärkulturen von Herzmuskelzellen neonataler Ratten enthalten - trotz des Verfahrens der "DAT" (s. 2.3) - wie isolierte Myokardpräparate (167) auch Bindegewebszellen (14). Ein Teil der spezifischen Glykosidbindung könnte daher durch eine Bindung an diese myokardiale Zellpopulation zu erklären sein.

Aus diesem Grunde wurden identische Bindungsexperimente - wie für Rattenherzmuskelzellen beschrieben - auch mit Bindegewebszellen aus dem gleichen Ausgangsmaterial, den Herzen neonataler Ratten, durchgeführt (s. 3.1). Die konzentrationsabhängige Bindung von [^3H]-g-Strophanthin unter Gleichgewichtsbedingungen zeigt auch in dieser Zellart sowohl einen hoch- als auch einen niederaffinen Bindungsprozeß mit Dissoziationskonstanten im gleichen Konzentrationsbereich wie bei Herzmuskelzellen, jedoch mit geringeren maximalen Bindungskapazitäten (s. Tab. 2; 3.1.2). Ein unterschiedliches Bindungsverhalten verschiedener myokardialer Zellpopulationen scheidet daher als Erklärungsmöglichkeit für die Existenz hoch- und niederaffiner Bindungsstellen im Rattenmyokard aus.

- 4) Lazdunski diskutiert schließlich die Möglichkeit, daß eine hochaffine Bindungsstelle in Herzmuskelzellprimärkulturen auf präsynaptischem Gewebe nervalen Ursprungs lokalisiert sein könnte (114). Diese Interpretation erscheint jedoch als sehr unwahrscheinlich, da nachgewiesen wurde, daß in Myozytenkulturen keine intakten neuronalen Strukturen mehr existieren (37).

Die konzentrationsabhängige [^3H]-g-Strophanthin-Bindung stellt eine Messung unter Gleichgewichtsbedingungen dar. Auch die Resultate kinetischer Experimente sind mit der Existenz hoch- und niederaffiner Bindungsstellen vereinbar.

Der Dissoziationsvorgang verläuft biphasisch (s. 3.1.3.2; Abb. 7 b, 7 d). Eine Erklärungsmöglichkeit wäre ein negativ kooperatives Verhalten einer Bindungsstelle: mit Abnahme der Rezeptorbesetzung nimmt die Affinität zum Rezeptor zu. Durch Dissoziationsexperimente in Gegenwart hoher g-Strophanthin-Konzentrationen konnte diese Bindungsstelleneigenschaft als mögliche Ursache des nichtlinearen Kurvenverlaufs allerdings ausgeschlossen werden (s. 3.1.3.2). Somit sprechen auch die Dissoziationsexperimente für die Existenz hoch- und niederaffiner Bindungsstellen in kultivierten Rattenherzmuskelzellen. Von jeder der beiden Bindungsstellen dissoziiert g-Strophanthin gemäß einer Reaktionskinetik 1. Ordnung ab (s. 3.1.3.2; Abb. 8 a, 8 b).

Überdies lassen sich weitere in isolierten Zellmembranen beschriebene Herzglykosidbindungsstelleneigenschaften in der intakten Rattenherzmuskelzelle finden (54). Die Bindung sowohl an die hoch- als auch an die niederaffine Bindungsstelle ist kaliumabhängig (s. 3.1.4; Abb. 9), durch Hitzedenaturierung unterdrückbar (s. Tab. 1) und sowohl der Assoziations- als auch der Dissoziationsvorgang der hochaffinen Bindungsstelle stellt eine temperaturabhängige Reaktion dar (s. 3.1.3.3), die einer Aktivierungsenergie bedarf (s. 3.1.3.4). Die Tatsache, daß Kriterien spezifischer Herzglykosidbindungsstellen wie K^+ -Abhängigkeit und Hitzempfindlichkeit sowohl für die hoch- als auch für die niederaffine Bindungsstelle Gültigkeit besitzen, spricht gegen die Annahme, es könnte sich bei einer der Bindungsstellen um einen - wie auch immer gearteten - Artefakt handeln.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der Nachweis von Herzglykosidbindungsstellen unterschiedlicher Affinität in kul-

tivierten Rattenherzmuskelzellen eine Eigenschaft der Herzmuskelzelle (und nicht von Bindegewebszellen oder nervalen Strukturen) ist und weder durch Internalisierungsprozesse noch durch ein negativ kooperatives Verhalten einer Digitalisbindungsstelle zu erklären ist.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Herzglykosidbindungsstelleneigenschaften kultivierter Rattenherzzellen stehen in guter Übereinstimmung mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine spezifische, zeit- und temperaturabhängige, reversible und K^+ -abhängige Herzglykosidbindung zeigen konnten (67, 133, 135). Während Lazdunski et al. den Befund der Existenz hoch- und niederaffiner Bindungsstellen bestätigten ($K_D = 3,9 \times 10^{-9}$ M bzw. $1 \cdot 10^{-6}$ M; 114), fand McCall lediglich etwa $1,6 \times 10^6$ spezifische hochaffine Herzglykosidbindungsstellen pro Zelle mit einer Dissoziationskonstanten von etwa 3×10^{-9} M (133). Friedman et al. kommen aufgrund ihrer Bindungsstudien zu dem Schluß, daß kultivierte Rattenherzmuskelzellen (und Bindegewebszellen neonataler Rattenherzen) sättigbare, kalium-sensitive hochaffine Strophanthin-Bindungsstellen mit einer K_D von $8,9 \times 10^{-8}$ M (bzw. $2,3 \times 10^{-8}$ M) sowie nichtsättigbare kaliuminsensitive Strophanthinbindungsstellen enthalten (67).

Die Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse ist unklar. Da die Inkubations- und Meßbedingungen vergleichbar sind (Gleichgewichtsbedingungen), ist am ehesten daran zu denken, daß diese beiden Arbeitsgruppen den "niederaffinen" Konzentrationsbereich aus meßtechnischen Gründen nicht ausreichend beurteilen konnten. So wurden in der konzentrationsabhängigen Bindung für g-Strophanthin-Konzentrationen $> 10^{-6}$ M keine spezifischen Bindungsdaten mehr angegeben; gerade in diesem Bereich kommt es jedoch zu einer Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle (s. Abb. 4 a, 4 b). Auch in isolierten Myozyten aus den Herzen adulter Ratten bindet g-Strophanthin nur an eine hochaffine Bindungsstelle ($K_D = 1,24 \times 10^{-7}$ M; 2). Aufgrund experimentell-

methodischer Grenzen konnten im niederaffinen Konzentrationsbereich keine sicheren Aussagen über eine spezifische Herzglykosidbindung gemacht werden. Die Autoren halten die Existenz einer zweiten, niederaffinen g-Strophanthin-Bindungsstelle allerdings für nicht ausgeschlossen (2). Der fehlende Nachweis spezifischer, sättigbarer niederaffiner Herzglykosidbindungsstellen in intakten Herzzellen neonataler bzw. adulter Ratten durch einige Autoren (2, 67, 133) dürfte somit auf meßtechnisch-methodischen Beschränkungen beruhen.

Zusammenfassend läßt sich daher festhalten, daß die intakte kultivierte Herzmuskelzelle neonataler Ratten hoch- und niederaffine Herzglykosidbindungsstellen besitzt, die g-Strophanthin zeitabhängig, sättigbar und reversibel zu binden vermögen. Durch K^+ -Ionen und Hitzedenaturierung läßt sich der spezifische, temperaturabhängige Bindungsvorgang sowohl im hoch- als auch im niederaffinen Konzentrationsbereich unterdrücken.

4.2 WIE KORRELIERT DIE HERZGLYKOSIDBINDUNG MIT BIOCHEMISCH-PHARMAKOLOGISCHEN EFFEKTEN IN KULTIVIERTEN RAT- TENHERZZELLEN?

Der alleinige Nachweis hoch- und niederaffiner Bindungsstellen berechtigt noch nicht, von einem Rezeptor zu sprechen. Erst wenn die Besetzung der Glykosidbindungsstellen von einer mit der Pharmakonbindung korrelierbaren biologischen Reaktion gefolgt ist, ist eine solche Klassifizierung gerechtfertigt (4, 35, 54). Für die Untersuchung des Herzglykosidrezeptors bedeutet dies, daß die Bindung des Glykosids entweder zu einer Zunahme der Kontraktionskraft (im isolierten Muskelpräparat) bzw. zu einer Zunahme von Pulsationsamplitude und Kontraktionsgeschwindigkeit (in kultivierten Herzmuskelzellen) und/oder zu einer Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes (in isolierten Muskelpräparaten und kultivierten Herzzellen) bzw. der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase-Aktivität (in Zellmembranhomogenaten) führen sollte (54).

4.2.1 Einfluß der g-Strophanthin-Bindung auf die Aktivität der Natriumpumpe

Sowohl in kultivierten Rattenherzmuskelzellen als auch in Rattenherzbindegewebszellen erfolgt die konzentrationsabhängige Hemmung der aktiven transmembranären ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme - mit konsekutivem Anstieg des Zell-Natrium und Abfall des Zell-Kalium - ausschließlich durch die Besetzung der niederaffinen Herzglykosidbindungsstelle. Eine alleinige Sättigung der hochaffinen Bindungsstelle bleibt ohne meßbaren Einfluß auf den Kationentransport (s. 3.2; 3.3; Abb. 11, 13; Tab. 2). Die Ursache der nur in einigen Experimenten nachweisbaren Stimulation der aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme durch niedrige g-Strophanthin-Konzentrationen ist unklar. In intakten isolierten Muskelpräparaten wird diese Stimulation der Natriumpumpe als Katecholamineffekt interpretiert (89, 115). Diese Erklärungsmöglichkeit trifft jedoch für Herzmuskelzellkulturen angesichts des Nachweises der Zerstörung intakter nervaler Strukturen durch den Präparationsvorgang (37) sehr wahrscheinlich nicht zu.

Auffallend ist weiterhin die Tatsache, daß erst ab einer mehr als 30prozentigen Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle der aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx gehemmt wird. Sieht man von möglichen experimentellen Fehlern (wie eine unpräzise Bestimmung der K_D der niederaffinen Bindungsstelle) ab, könnte dieser Befund mit einer Transportreserve der Natriumpumpe, die bereits für Hühnerherzmuskelzellen nachgewiesen wurde (188), vereinbar sein. Durch eine Hemmung eines Teils der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Moleküle kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration. Diese Na^+ -Ionen vermögen die Aktivität ungehemmter Pumpmoleküle zu steigern (188, 193). Dadurch kann, trotz einer Rezeptorbesetzung von bis zu 30 %, eine Änderung der zellulären Kationengehalte und des aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx ausbleiben.

Neben den bisher diskutierten Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen unterstützen auch kinetische Experimente die Beob-

achtung, daß die niederaffine Bindungsstelle mit einer Hemmung der Natriumpumpe verknüpft ist. Nach einer Blockade des transmembranären Kationentransportes durch 10^{-5} M g-Strophanthin erfolgt die Dissoziation des Herzglykosids von der niederaffinen Bindungsstelle mit etwa der gleichen Halbwertszeit wie die Reaktivierung des $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Influx (s. 3.3; Abb. 12).

McCall berichtet über eine halbmaximale Hemmung der aktiven $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme durch 10^{-6} M g-Strophanthin (133). Dieser Wert korreliert gut mit dem Herzglykosidkonzentrationsbereich, der zu einer Sättigung der niederaffinen Bindungsstelle führt. Auch in isolierten Zellmembranen des neonatalen Rattenherzens bewirkt ausschließlich die Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle eine Hemmung der Enzymaktivität (s. Abb. 5) - die alleinige Sättigung der hochaffinen Bindungsstelle beeinflusst die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität nicht.

In intakten kultivierten Rattenherzzellen ist somit lediglich die Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle mit einer Hemmung der aktiven transmembranären $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme verknüpft. Mit der verwendeten Methodik läßt sich im "hochaffinen" Konzentrationsbereich kein Einfluß auf die Natriumpumpenaktivität nachweisen.

4.2.2 Einfluß von g-Strophanthin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit

Eine Zunahme der Kontraktionskraft durch Herzglykoside läßt sich - anders als in isolierten Herzmuskelpräparaten - in kultivierten Herzmuskelzellen nicht messen (11, 83, 84). Als Parameter des positiv inotropen Effektes ist die Registrierung der Pulsationsamplitude bzw. deren erste Ableitung - der Kontraktionsgeschwindigkeit - üblich (17, 164); positiv inotrop wirksame Pharmaka erhöhen die Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit (17, 23, 101, 102, 129, 164).

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen ($[K^+] = 1,5 \text{ mM}$) läßt sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit elektrisch stimulierter Rattenherzmuskelzellen erst durch $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ g-Strophanthin, nicht jedoch durch geringere Konzentrationen, messen. Höhere Konzentrationen als $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ sind toxisch (Arrhythmien) (Abb. 15). Der positiv inotrope Effekt ist rasch auswaschbar (s. Abb. 14); die Halbwertszeit liegt in der gleichen Größenordnung wie die der Herzglykosiddissoziation von der niederaffinen Bindungsstelle (s. Abb. 7 d).

Aus der Tatsache, daß eine Zunahme von Kontraktionsamplitude und -geschwindigkeit kultivierter Rattenherzmuskelzellen lediglich im Konzentrationsbereich der niederaffinen Bindungsstellen meßbar ist, und aus den Ergebnissen kinetischer Experimente, läßt sich der positiv inotrope Effekt in kultivierten Rattenherzmuskelzellen eindeutig der Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle zuordnen.

Es ist durchaus denkbar, daß auch durch alleinige Besetzung der hochaffinen Bindungsstelle eine Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit erfolgen kann. Das verwendete elektrooptische System (s. 2.8) könnte zu träge sein, um geringe Amplitudenänderungen zu erfassen (185).

Okarma et al. fanden in kultivierten Rattenherzzellen bereits durch $10^{-9} \text{ M} - 10^{-8} \text{ M}$ Digoxin hervorgerufene positiv inotrope Effekte (143). Diese "hochaffine" Wirkung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Vergleichbare Experimente anderer Arbeitsgruppen sind bisher nicht publiziert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in kultivierten Rattenherzmuskelzellen sowohl die Hemmung der Natriumpumpe (s. 4.2.1) als auch der positiv inotrope Effekt (s. 4.2.2) mit einer Besetzung lediglich der niederaffinen Glykosidbindungsstelle verknüpft ist, die daher als Herzglykosidrezeptor be-

zeichnet werden kann. Während in biologischen Systemen gewöhnlich hochaffine Bindungsprozesse spezifische Vorgänge darstellen, findet sich in kultivierten Rattenherzmuskelzellen die "paradoxe" Situation, daß dieser Bindungsstelle keinerlei Rezeptorfunktion zugeordnet werden kann. Über ein ähnliches Beispiel wurde bei der Charakterisierung von Dopamin-Rezeptoren berichtet. Auch hier gibt es eine hochaffine Bindungsstelle ohne Rezeptorfunktion (172). Der fehlende Nachweis einer Rezeptorfunktion hochaffiner Glykosidbindungsstellen könnte beispielsweise auf Inaktivierungsvorgängen durch die Präparation beruhen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß der positiv inotrope Effekt im hochaffinen Konzentrationsbereich altersabhängig und im neonatalen Rattenherzen daher noch nicht nachweisbar ist. Untersuchungen an isolierten Muskelpräparaten aus den Herzen neonataler Ratten könnten diese Frage weiter klären.

4.3 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die an diversen experimentellen Modellen des Rattenherzens (isoliertes Muskelpräparat, Langendorff-Präparat, intakte kultivierte Herzzellen, Membranhomogenate) erhobenen Befunde lassen folgende Aussagen zum kardialen Wirkungsmechanismus von Herzglykosiden an dieser Spezies zu:

Der positiv inotrope Effekt zeigt konzentrationsabhängig einen biphasischen Verlauf (2, 61, 62, 77, 78, 88, 103, 104). Die Besetzung einer hochaffinen Bindungsstelle - nachweisbar in mit $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase angereicherten Membranpräparationen adulter (52, 61, 62, 88, 141) und neonataler (s. Abb. 6) Tiere, in isolierten Muskelstreifen (52) sowie in kultivierten Rattenherzzellen (s. 3.1.2; Abb. 4 b) - steigert die Kontraktionskraft um etwa 30 % des maximal möglichen inotropen Effektes (77). Letzterer wird erst bei zusätzlicher Besetzung einer niederaffinen Bindungsstelle erreicht, die sich in Membranhomogenaten adulter

(52, 61, 62, 88, 141) sowie neonataler (s. Abb. 6) Rattenherzen und in kultivierten Rattenherzzellen (s. 3.1.2; Abb. 4 b) findet, mit einer Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität (2, 61, 62, 88, 141) bzw. der aktiven $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme (s. Abb. 11, 13; 52) einhergeht und auch für toxische Effekte (Kontrakturen, Arrhythmien, Anstieg der diastolischen Spannung) verantwortlich ist (52, 103, 104). Inwieweit der transmembranäre Kationentransport bzw. die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Enzymaktivität durch Besetzung der hochaffinen Bindungsstelle beeinflusst wird, wird kontrovers diskutiert. Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität in Membranhomogenaten soll sowohl unbeeinflusst (2, 52, 88) als auch gehemmt sein können (61, 62, 141). Ferner wird berichtet, daß niedrige g-Strophanthin-Konzentrationen von $1 - 2 \times 10^{-8}$ M eine hochaffine $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ - isoliert aus mit Ca^{2+} -freier Lösung perfundierten Rattenherzen - hemmen können. In Gegenwart physiologischer Ca^{2+} -Konzentrationen war diese "Enzymform" allerdings nicht nachweisbar (120, 127, 128). Aber nicht nur in Enzympräparationen unter teilweise unphysiologischen Bedingungen, sondern auch im intakten, isolierten Muskelpräparat finden sich Hinweise auf eine Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes. So ist mit ionensensitiven Mikroelektroden im Konzentrationsbereich der hochaffinen Bindungsstelle eine Zunahme der intrazellulären Na^+ -Aktivität meßbar (79). Zusammenfassend läßt sich also festhalten, daß offensichtlich nicht nur der "niederaffine", sondern ebenso der "hochaffine" positiv inotrope Effekt durch Herzglykoside mit einer Hemmung der Natriumpumpe verknüpft ist.

Der biphasische inotrope Effekt im Rattenherz hat seine molekular-zelluläre Grundlage in der Existenz unterschiedlicher Herzglykosidbindungsstellen der Herzzellmembran (52, 61, 62, 88, 141). Diese lassen sich sowohl in Membranhomogenaten, in der intakten kultivierten Rattenherzmuskelzelle, als auch in Rattenherzbindegewebszellen nachweisen (s. 3.1.2; Abb. 4 b). Damit konnte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß eine der in Enzympräparationen existenten Bindungsstellen einen Artefakt

durch den Präparationsvorgang oder durch Bindungsprozesse an myokardiale Bestandteile wie Nerven-, Gefäß- oder Bindegewebszellen darstellt. Allerdings unterscheiden sich sowohl die Dissoziationskonstanten als auch die maximalen Bindungskapazitäten der hoch- bzw. niederaffinen Bindungsstellen in den unterschiedlichen experimentellen Modellen. Die K_D der hochaffinen Bindungsstelle beträgt $1 - 2,3 \times 10^{-7}$ M in Membranen adulter (52), $2,2 \times 10^{-8}$ M in denen neonataler Ratten (190) und $3,2 \cdot 10^{-8}$ M in intakten kultivierten Rattenherzmuskelzellen (s. Tab. 2). Der relative Anteil an der Gesamtbindungsstellenzahl hat einen Wert von 10 % (52), 1 % bzw. 7 % (s. Tab. 2; 190). Für die niederaffine Bindungsstelle wurden Dissoziationskonstanten von $2,8 \times 10^{-5}$ M (52), $1,3 \times 10^{-4}$ M und $7,1 \times 10^{-6}$ M (190) bestimmt. Verschiedene Inkubations- und Meßbedingungen, wie die Ermittlung der g-Strophanthin-Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen an Herzmembranen neonataler Ratten (190) bzw. in einem initialen Bindungsmaximum an Homogenaten adulter Rattenherzen (52), müssen als mögliche Ursachen dieser Unterschiede berücksichtigt werden. Weiterhin könnten das Alter der Tiere (38, 108) oder Membranveränderungen durch unterschiedliche Präparationsvorgänge als Ursache anzuschuldigen sein.

Unter Zugrundelegung der Kriterien für Herzglykosidrezeptoren (54) und den Ergebnissen an Membranpräparationen und isolierten Muskelpräparaten adulter Rattenherzen sind beide Herzglykosidbindungsstellen dort als Rezeptoren zu bezeichnen, da sie zu einem biologischen Effekt (Enzymhemmung, positive Inotropie) führen. In der kultivierten Rattenherzmuskelzelle ist dagegen lediglich der niederaffinen Bindungsstelle eine Rezeptorfunktion zuzuordnen (s. 4.1, 4.2). Die physiologische Rolle der hochaffinen Bindungsstelle bedarf weiterer Klärung. Folgende Ursachen können diskutiert werden:

- a) Bei den hoch- und niederaffinen Bindungsstellen handelt es sich um unterschiedliche $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Isoenzyme.

Über die Existenz derartiger Isoenzyme wurde in Hirngewebe diverser Spezies (29, 177), in der Nauplialarve des Salzkrebse (148) sowie in Fettzellen (159) berichtet. Mansier fand eine heterogene Population von enzymatisch aktiven $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Formen in sarkolemmlen Vesikeln, die aus in Ca^{2+} -freier Lösung perfundierten Rattenherzen gewonnen wurden (120, 127, 128). 45 % - 65 % der Enzymaktivität konnte durch g-Strophanthin-Konzentrationen von 10^{-9} M - 3×10^{-7} M und die restliche Aktivität im Bereich von 3×10^{-5} M - 10^{-3} M gehemmt werden. Perfundierte man die Herzen vor der Enzympräparation mit Ca^{2+} -haltigen Lösungen, so erhielt man lediglich eine homogene $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Population mit niedriger Affinität zu g-Strophanthin ($\text{IC}_{50} = 4 \times 10^{-5}$ M). Von den Autoren wird als mögliche Ursache dieser Beobachtung die Existenz von Isoenzymen der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase diskutiert (120).

- b) Die hoch- und niederaffinen Bindungsstellen entsprechen unterschiedlichen, ineinander überführbaren Konformationen eines $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküls.

Diese kürzlich von Repke wieder erneut in die Diskussion gebrachte Vorstellung (158) wird auch von Mansier als mögliche Erklärung der Beobachtungen an sarkolemmlen Vesikeln erörtert (127, 128). Da die spezifische Gesamtaktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase unabhängig von dem Präparationsvorgang konstant bleibt, ist es denkbar, daß durch die Ca^{2+} -freie Perfusion ein Teil der niederaffinen Enzymmoleküle in eine hochaffine Form umgewandelt wird. Ein derartiges Überführen unterschiedlicher Konfigurationszustände von Herzglykosidrezeptoren durch K^+ -, Mg^{2+} und para-Nitrophenylphosphat ist beispielsweise auch in aus Hundeherzen gewonnenen Kardiozyten möglich (146).

- c) Schließlich könnte es sich bei dem hochaffinen Bindungsprozeß um eine Interaktion mit nicht-funktionellen $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Molekülen handeln.

Lazdunski diskutiert in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, daß das Säugergenom mehrere Gene für die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase enthält. Abhängig vom Entwicklungszustand sollte dann eine unterschiedliche Genexpression erfolgen (114). Der Befund einer "funktionslosen" Herzglykosidbindungsstelle in intakten Herzmuskelzellen neonataler Ratten wäre auch mit dieser Vorstellung vereinbar.

Die Frage, ob die hochaffine Glykosidbindungsstelle in kultivierten Rattenherzzellen überhaupt mit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in Beziehung steht, läßt sich in Zellkulturen weiter abklären. So ist es möglich, mit radioaktiv markierten, monoklonalen $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-spezifischen Antikörpern die Anzahl funktioneller und nicht-funktioneller Enzymmoleküle zu bestimmen und den erhaltenen Wert mit den Ergebnissen der konzentrationsabhängigen Herzglykosidbindung zu vergleichen (121). Weiterhin könnten bestimmte Versuchsbedingungen, wie die Zellzüchtung in Gegenwart niedriger K^+ -Konzentrationen oder definierter g-Strophanthin-Konzentrationen, die in Hühnerherzzellen zu einer Zunahme der Natriumpumpenzahl führen (189, 191), weitere Aufschlüsse geben. Im Falle einer Verknüpfung der hochaffinen Bindungsstelle mit einem funktionellen $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Molekül würde man eine Zunahme der Anzahl der Bindungsstellen erwarten.

Auch wenn zum jetzigen Zeitpunkt der hochaffinen Glykosidbindungsstelle kultivierter Rattenherzmuskelzellen noch keine Rezeptorfunktion zugeordnet werden kann, ist die Existenz eines positiv inotropen Effektes unabhängig von toxischen Nebenwirkungen aufgrund des Vorhandenseins zweier funktionell unterschiedlicher Herzglykosidrezeptoren im adulten Rattenherzen experimentell gesichert. Sollte der Nachweis derartiger Rezeptorpopulationen auch im menschlichen Myokard gelingen, würde

sich damit die Möglichkeit eröffnen, neue, spezifischere und sicherere positiv inotrop wirksame Pharmaka für die Therapie der Herzinsuffizienz zu entwickeln. Das Kardinalproblem der geringen therapeutischen Breite kardioaktiver Steroide wäre damit lösbar.

ZUSAMMENFASSUNG

In intakten kultivierten Muskel- und Bindegewebszellen sowie in Zellmembranen des neonatalen Rattenherzens wurde die [^3H]-g-Strophanthin-Bindung charakterisiert und mit der Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase (Zellmembranen) bzw. der aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme und dem intrazellulären Kalium- und Natriumgehalt (Herzzellen) quantitativ korreliert. Ferner wurde die Wirkung von g-Strophanthin auf die Pulsationsamplitude und Kontraktionsgeschwindigkeit elektrisch stimulierter Rattenherzmuskelzellen untersucht.

- 1) Sowohl in Rattenherzmuskelzellen als auch in Rattenherzbindegewebszellen finden sich zwei Klassen von Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität zu g-Strophanthin. Die Dissoziationskonstante K_D der hochaffinen Bindungsstelle in Rattenherzmuskelzellen beträgt $3,2 \times 10^{-8} \text{ M}$ und die maximale Bindungskapazität B_{max} $0,2 \text{ pmol/mg Protein}$ (etwa 80.000 Bindungsstellen/Zelle). Dagegen hat die niederaffine Bindungsstelle eine Dissoziationskonstante K_D von $7,1 \times 10^{-6} \text{ M}$ und eine maximale Bindungskapazität B_{max} von $2,6 \text{ pmol/mg Protein}$ (etwa 1.000.000 Bindungsstellen/Zelle). Die g-Strophanthin-Bindung ist sättigbar, temperaturabhängig und reversibel. Der Assoziationsvorgang ist mit einer Reaktionskinetik 2. Ordnung (Assoziationsrate $k_{+1} = 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$), und der nichtlineare Dissoziationsprozeß mit einer Reaktionskinetik 1. Ordnung zweier Klassen von Bindungsstellen vereinbar (Dissoziationskonstante $k_{-1} = 1,4 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ bzw. $2,1 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$). Nach Hitzedenaturierung erfolgt weder im hoch- noch im niederaffinen Konzentrationsbereich eine spezifische g-Strophanthin-Bindung. Kalium hemmt die Bindung sowohl an die hoch- als auch an die niederaffine Bindungsstelle, vermindert die Assoziationsrate k_{+1} , hat jedoch keinerlei Einfluß auf den Dissoziationsvorgang.

- 2) Die Bindung von g-Strophanthin an die niederaffine Bindungsstelle in Rattenherzzellen führt zu einer Hemmung der aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme ($\text{IC}_{50} = 1,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ für Muskelzellen bzw. $1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ für Bindegewebszellen), zu einem Abfall der zellulären Kaliumgehalte ($\text{IC}_{50} = 1,9 \times 10^{-5} \text{ M}$ für Muskelzellen bzw. $1,4 \times 10^{-5} \text{ M}$ für Bindegewebszellen) und einem Anstieg der zellulären Natriumgehalte ($\text{IC}_{50} = 10^{-5} \text{ M} - 10^{-4} \text{ M}$).
- 3) Die g-Strophanthin-Bindung an die niederaffine Bindungsstelle mit Strophanthinkonzentrationen $\geq 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ bewirkt eine konzentrationsabhängige Zunahme von Pulsationsamplitude und Kontraktionsgeschwindigkeit elektrisch stimulierter Rattenherzmuskelzellen. Die alleinige Absättigung der hochaffinen Bindungsstelle bleibt ohne Einfluß auf diese Kontraktionsparameter.
- 4) In Übereinstimmung mit den Befunden an der intakten Herzzelle finden sich auch in Zellmembranen aus den Herzen neonataler Ratten zwei g-Strophanthin-Bindungsstellen ($K_D = 2,2 \times 10^{-8} \text{ M}$ bzw. $1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$), wobei nur die Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle mit einer meßbaren Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität ($\text{IC}_{50} = 4,8 \times 10^{-5} \text{ M}$) korreliert.
- 5) Auch die intakte kultivierte Rattenherzzelle besitzt - ebenso wie Zellmembranen des adulten Rattenherzens - zwei Herzglykosidbindungsstellen. Bei Anwendung der Kriterien für Glykosidrezeptoren (54) kann, nach den vorgelegten Daten, die niederaffine Bindungsstelle in kultivierten Rattenherzzellen als Herzglykosidrezeptor bezeichnet werden, während Bedeutung und Funktion der hochaffinen Bindungsstelle in Zellkulturen noch weiterer Klärung bedarf.
- 6) Durch die an unterschiedlichen experimentellen Modellen (isoliertes Muskelpräparat, Langendorff-Präparat, Membran-

homogenate, intakte kultivierte Herzzellen) erhobenen Befunde kann die Existenz zweier funktionell unterschiedlicher Herzglykosidrezeptoren im Rattenherz als gesichert gelten. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen an kultivierten Rattenherzzellen ist ausgeschlossen, daß der Nachweis von g-Strophanthin-Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität durch eine Bindung an verschiedene myokardiale Zellpopulationen (Muskelzellen bzw. Bindegewebszellen) zu erklären ist. Die Besetzung sowohl der hoch- als auch der niederaffinen Bindungsstelle führt zu einer Steigerung der Kontraktionskraft - toxische Effekte sind dagegen nur mit der Bindung an den niederaffinen Rezeptor verknüpft. Somit ist die Voraussetzung gegeben, positiv inotrop wirksame Pharmaka zu suchen bzw. zu synthetisieren, die selektiv mit dem hochaffinen Rezeptor interagieren können. Wirkungen (positive Inotropie) und Nebenwirkungen (Arrhythmien) kardioaktiver Steroide wären damit nicht mehr unweigerlich miteinander verknüpft.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 AARHUS, L.L., SHEPHERD, J.T., TYCE, G.M., VERBEUREN, T.J., VANHOUTTE, P.M.: Contractions of canine vascular smooth muscle cells caused by ouabain are due to release of norepinephrine from adrenergic nerve endings. *Circ. Res.* 52, 501 - 507 (1983)
- 2 ADAMS, R.J., SCHWARTZ, A., GRUPP, G., GRUPP, I., LEE, S.W., WALLICK, E.T., POWELL, T., TWIST, V.W., GATHIRAM, P.: High-affinity ouabain binding site and low dose positive inotropic effect in rat myocardium. *Nature* 296, 167 - 169 (1982)
- 3 AKERA, T., BENNETT, R.T., OLGAARD, M.K., BRODY, T.M.: Cardiac Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase inhibition by ouabain and myocardial sodium: a computer simulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 199, 287 - 297 (1976)
- 4 AKERA, T.: Membrane adenosinetriphosphatase: a digitalis receptor? *Science* 198, 569 - 574 (1977)
- 5 AKERA, T., BRODY, T.M.: The role of Na^+ + K^+ -ATPase in the inotropic action of digitalis. *Pharmacol. Rev.* 29, 187 - 220 (1978)
- 6 AKERA, T.: Effects of cardiac glycosides on Na^+ , K^+ -ATPase. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 56/1, "Cardiac Glycosides", Herausgeber: K. Greeff; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 287 - 336 (1981)
- 7 AKERA, T., BRODY, T.M.: Sodium ion and the cardiac actions of digitalis. *Trends Pharmacol. Sci.* 6, 296 - 298 (1985)
- 8 ALLEN, D.G., BLINKS, J.R.: Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature* 273, 509 - 513 (1978)
- 9 v. ARNIM, T., KRAWIETZ, W., VOGT, W., ERDMANN, E.: Is the determination of serum digoxin concentration useful for the diagnosis of digitalis toxicity? *Int. J. Clin. Pharmacol.* 18, 261 - 268 (1980)
- 10 ARNOLD, S.B., BYRD, R.C., MEISTER, W., MELMON, K., CHEITLIN, M.D., BRISTOW, J.D., PARMLEY, W.W., CHATTERJEE, K.: Long-term digitalis therapy improves left ventricular function in heart failure. *N. Engl. J. Med.* 303, 1443 - 1448 (1980)
- 11 AUCLAIR, M.-C., VERNIMMEN, C.: Electro-optical technique for recording contractile activity of cultured heart cells. *Biol. Cellulaire* 37, 125 - 130 (1980)

- 12 BAKER, P.F., BLANCHETTIN, M.P., HANCOCK, A.L., CHENHART, R.A.: The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J. Physiol.* 209, 431 - 458 (1969)
- 13 BARRY, W.B., BARRETT, G.J., MIURA, D.S., SMITH, T.W.: Changes in cellular Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ contents, membrane cell transport rate and contractile state during removal of cardiac glycosides from cultured chick heart cells. *Circ. Res.* 49, 141 - 149 (1981)
- 14 BARTSCHKE, G.: Myokardiale Wirkungen des Oxygens, des Vanadium. Untersuchungen an kultivierten Herzzellen. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades in der gesamten Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München (1983)
- 15 BENTLEY, M., WILLIAMS, E., PATTER, T., PROFF, D.: Interdependence of ion transport and the action of ouabain in heart muscle. *Br. J. Pharmacol.* 61, 19 - 27 (1977)
- 16 BERS, D.M., PHILIPSON, K.D., NISHIMOTO, A.Y.: Sodium-calcium exchange and evidence of isolated cardiac sarcoplasmic vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 611, 338 - 371 (1980)
- 17 BILLET, G., BARRY, W.B., SMITH, T.W.: Isotopic effects and changes in sodium and calcium contents associated with inhibition of membrane cell transport by ouabain in cultured myocardial cells. *J. Gen. Physiol.* 76, 479 - 494 (1979)
- 18 BLOMDEL, E., KOJEN, I., CHENEVAL, J.P.: Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia* 27, 356 - 358 (1971)
- 19 BROWN, L., WILSON, E., BROWMAN, E.: Consequences of specific [³H] ouabain binding to guinea pig left atria and cardiac cell membranes. *Biochem. Pharmacol.* 32, 423 - 435 (1982)
- 20 BROWN, L., BROWMAN, E.: Purification of thyrocalcitonin receptor and human cardiac (Na⁺ + K⁺)-ATPase: evidence for two binding sites in cell membranes. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2182 - 2195 (1982)
- 21 BROWN, L., BROWMAN, E.: Two binding sites for ouabain in cardiac cell membranes. *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 51 - 55 (1984)
- 22 BUCHHEIT, D.: Probleme der Digitalistherapie. *Schweiz. med. wochs.* 113, 748 - 749 (1983)

- 23 BURT, J.M., LANGER, G.A.: Ca^{2+} distribution after Na^{+} pump inhibition in cultured neonatal rat myocardial cells. *Circ. Res.* 51, 543 - 550 (1982)
- 24 BURT, J.M.: Electrical and contractile consequences of Na^{+} or Ca^{2+} gradient reduction in cultured heart cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 14, 99 - 110 (1982)
- 25 BUSSE, F., LÜLLMANN, H., PETERS, T.: Concentration dependence of the binding of ouabain to isolated guinea pig atria. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1, 687 - 698 (1979)
- 26 CALDWELL, P.C., KEYNES, R.D.: The effects of ouabain on the efflux of sodium from a squid giant axon. *J. Physiol.* 148, 8 - 9 (1959)
- 27 CARONI, P., REINLIB, L., CARAFOLI, E.: Charge movement during the Na^{+} - Ca^{2+} exchange in heart sarcolemmal vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6354 - 6358 (1980)
- 28 CATTELL, M., GOLD, H.: The influence of digitalis glycosides on the force of contraction of mammalian cardiac muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 62, 116 - 125 (1938)
- 29 CHARNOCK, J.S., SIMONSON, L.P., ALMEIDA, A.F.: Variation in sensitivity of the cardiac glycoside receptor characteristics of $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase to lipolysis and temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 465, 77 - 92 (1977)
- 30 CHOI, Y.R., AKERA, T.: Kinetic studies on the interaction between ouabain and $(\text{Na}^{+}, \text{K}^{+})$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 481, 648 - 659 (1977)
- 31 COOK, J.S., TATE, E.H., SHAFFER, C.: Uptake of $[^3\text{H}]$ ouabain from the cell surface into the lysosomal compartment of HeLa cells. *J. Cell. Physiol.* 110, 84 - 92 (1982)
- 32 DAL PRA, P., ROSSINI, L., SEGRE, G.: The kinetics of ouabain uptake in frog heart in relation to the kinetics of inotropic effect and to the activation of transport ATPases. *Pharmac. Res. Commun.* 2, 177 - 191 (1970)
- 33 DE MEYTS, P., ROTH, J.: Cooperativity in ligand binding: a new graphic analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1118 - 1126 (1975)
- 34 DE MEYTS, P.: Cooperative properties of hormone receptors in cell membranes. *J. Supramol. Struct.* 4, 241 - 258 (1976)
- 35 DE MEYTS, P., ROUSSEAU, G.G.: Receptor concepts. A century of evolution. *Circ. Res.* 46, 1-3 - 1-9 (1980)

- 36 DE POVER, A., GODFRAIND, T.: Interaction of ouabain with $(Na^+ + K^+)$ -ATPase from human heart and from guinea pig heart. *Biochem. Pharmacol.* 28, 3051 - 3056 (1979)
- 37 DOW, J.W., HARDING, N.G.L., POWELL, T.: Isolated cardiac myocytes. II. Functional aspects of mature cells. *Cardio-vasc. Res.* 15, 549 - 579 (1981)
- 38 DOWELL, R.T.: Metabolic and contractile function enhancement during rat heart postnatal development. *Mech. Ageing Dev.* 25, 307 - 321 (1984)
- 39 DRANSFELD, H., GREEFF, K., SCHORN, A., TING, B.T.: Calcium uptake in mitochondria and vesicles of heart and skeletal muscle in presence of potassium, sodium, k-strophanthin and pentobarbital. *Biochem. Pharmacol.* 18, 1335 - 1345 (1969)
- 40 EISNER, D.A., LEDERER, W.J.: The relationship between sodium pump activity and twitch tension in cardiac Purkinje fibers. *J. Physiol. (Lond.)* 303, 475 - 494 (1980)
- 41 ELLIS, D.: The effects of external cations and ouabain on the intracellular sodium activity of sheep heart Purkinje fibers. *J. Physiol. (Lond.)* 273, 211 - 240 (1977)
- 42 ERDMANN, E., SCHONER, W.: Ouabain-receptor interactions in $(Na^+ + K^+)$ -ATPase preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants. *Biochim. Biophys. Acta* 307, 386 - 398 (1973)
- 43 ERDMANN, E., SCHONER, W.: Ouabain-receptor interactions in $(Na^+ + K^+)$ -ATPase preparations. II. Effect of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants. *Biochim. Biophys. Acta* 330, 302 - 315 (1973)
- 44 ERDMANN, E., SCHONER, W.: Ouabain-receptor interactions in $(Na^+ + K^+)$ -ATPase preparations. III. On the stability of the ouabain receptor against physical treatment, hydrolases and SH reagents. *Biochim. Biophys. Acta* 330, 316 - 324 (1973)
- 45 ERDMANN, E., SCHONER, W.: Ouabain-receptor interactions in $(Na^+ + K^+)$ -ATPase preparations. IV. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glycoside receptor. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 283, 335 - 356 (1974)
- 46 ERDMANN, E., SCHONER, W.: Eigenschaften des Receptors für Herzglykoside. *Klin. Wochenschr.* 52, 705 - 718 (1974)
- 47 ERDMANN, E., HASSE, W.: Quantitative aspects of ouabain binding to human erythrocyte and cardiac membranes. *J. Physiol. (Lond.)* 251, 671 - 682 (1975)

- 48 ERDMANN, E., PATZELT, R., SCHONER, W.: The cardiac glycoside receptor: Its properties and its correlation to nucleotide binding sites, phosphointermediate, and $(Na^+ + K^+)$ -ATPase activity. Recent Advanc. Stud. Cardiac. Struc. Metabol. 9, 329 - 335 (1976)
- 49 ERDMANN, E., PHILIPP, G., TANNER, G.: Ouabain-receptor interactions in $(Na^+ + K^+)$ -ATPase preparations. A contribution to the problem of nonlinear Scatchard plots. Biochim. Biophys. Acta 455, 287 - 296 (1976)
- 50 ERDMANN, E., PRESEK, P., SWOZIL, R.: Über den Einfluß von Kalium auf die Bindung von Strophanthin an menschliche Herzmuskelzellmembranen. Klin. Wochenschr. 54, 383 - 387 (1976)
- 51 ERDMANN, E.: Cell membrane receptors for cardiac glycosides in the heart. Basic Res. Cardiol. 72, 315 - 325 (1977)
- 52 ERDMANN, E., PHILIPP, G., SCHOLZ, H.: Cardiac glycoside receptor, $(Na^+ + K^+)$ -ATPase activity and force of contraction in rat heart. Biochem. Pharmacol. 29, 3219 - 3229 (1980)
- 53 ERDMANN, E., PHILIPP, G., SCHOLZ, H.: Evidence for two receptors for cardiac glycosides in the heart. In: Cell membrane in function and dysfunction of vascular tissue. Herausgeber: T. Godfraind, P. Meyer, Elsevier North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 76 - 84 (1981)
- 54 ERDMANN, E.: Influence of cardiac glycosides on their receptor. In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 56/I, "Cardiac Glycosides", Herausgeber: K. Greeff; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 337 - 380 (1981)
- 55 ERDMANN, E.: Therapie mit Herzglykosiden. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1983)
- 56 ERDMANN, E.: Neue Aspekte der Digitalistherapie. Internist 24, 422 - 428 (1983)
- 57 ERDMANN, E., BROWN, L., WERDAN, K.: Two receptors for cardiac glycosides in the heart. Basic Res. Cardiol. 79 (Suppl.), 21 - 26 (1984)
- 58 ERDMANN, E.: Stellenwert der Herzglykoside in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Klin. Wochenschr. 62, 507 - 511 (1984)
- 59 ERDMANN, E., WERDAN, K., BROWN, L.: Multiplicity of cardiac glycoside receptors in the heart. Trends Pharmacol. Sci. 6, 293 - 295 (1985)

- 60 FABIATO, A., FABIATO, F.: Activation of skinned cardiac cells. Subcellular effects of cardioactive drugs. *Europ. J. Cardiol.* 1/2, 143 - 155 (1973)
- 61 FINET, M., NOEL, F., GODFRAIND, T.: Inotropic effect and binding sites of ouabain to rat heart. *Arch. int. Pharmacodyn.* 256, 168 - 170 (1982)
- 62 FINET, M., GODFRAIND, T., NOEL, F.: The inotropic effect of ouabain and its antagonism by dihydroouabain in rat isolated atria and ventricles in relation to specific binding sites. *Br. J. Pharmacol.* 80, 751 - 759 (1983)
- 63 FOREST, C., PONZIO, G., ROSSI, B., LAZDUNSKI, M., AILHAUD, G.: $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ levels in preadipocyte cell lines established from genetically-obese and non-obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 422 - 428 (1982)
- 64 FOZZARD, H.A., SHEETS, M.F.: Cellular mechanism of action of cardiac glycosides. *J. Am. Coll. Cardiol.* 5 (Suppl.), 10A - 15A (1985)
- 65 FRICKE, U., KLAUS, W.: Evidence for two different Na^+ -dependent $[\text{}^3\text{H}]$ -ouabain binding sites of a $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ of guinea-pig hearts. *Br. J. Pharmacol.* 61, 423 - 428 (1977)
- 66 FRICKE, U.: Two ouabain binding sites in guinea pig heart $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$. Differentiation by sodium and erythrosin B. *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 119 - 127 (1984)
- 67 FRIEDMAN, I., SCHWALB, H., HALLAQ, H., PINSON, A., HELLER, M.: Interaction of cardiac glycosides with cultured cardiac cells. II. Biochemical and electron microscopic studies on the effects of ouabain on muscle and non-muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* 598, 272 - 284 (1980)
- 68 GHYSEL-BURTON, J., GODFRAIND, T.: Stimulation and inhibition by ouabain of the sodium pump in guinea pig atria. *Br. J. Pharmacol.* 55, 249 P (1975)
- 69 GHYSEL-BURTON, J., GODFRAIND, T.: Stimulation and inhibition of the sodium pump by cardioactive steroids in relation to their binding sites and their inotropic effect on guinea-pig isolated atria. *Br. J. Pharmacol.* 66, 175 - 184 (1979)
- 70 GLITSCH, H.G., REUTER, H., SCHOLZ, H.: The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea pig auricles. *J. Physiol.* 209, 25 - 43 (1970)
- 71 GODFRAIND, T., GHYSEL-BURTON, J.: Binding sites related to ouabain-induced stimulation or inhibition of the sodium pump. *Nature* 265, 165 - 166 (1977)

- 72 GODFRAIND, T.: Stimulation and inhibition of the Na^+ , K^+ -pump by cardiac glycosides. In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 56/I, "Cardiac Glycosides", Herausgeber: K. Greeff; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 381 - 393 (1981)
- 73 GODFRAIND, T.: Subclassification of cardiac glycoside receptors. Basic Res. Cardiol. 79 (Suppl.), 27 - 34 (1984)
- 74 GOODMAN, D.J., ROSSEN, R.M., INGHEM, R., RIEDER, A.K., HARRISON, D.C.: Sinus node function in the denervated human heart. Br. Heart J. 37, 612 - 618 (1975)
- 75 GOODMAN, D.J., ROSSEN, R.M., CANNOM, D.S., RIDER, A.K., HARRISON, D.C.: Effect of digoxin on atrioventricular conduction. Circulation 51, 251 - 256 (1975)
- 76 GOSHIMA, K., WAKABAYASHI, S.: Involvement of an Na^+ - Ca^{2+} -exchange system in genesis of ouabain induced arrhythmias of cultured myocardial cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 13, 489 - 509 (1981)
- 77 GRUPP, I.L., GRUPP, G., SCHWARTZ, A.: Digitalis receptor desensitization in rat ventricle: ouabain produces two inotropic effects. Life Sci. 29, 2789 - 2794 (1981)
- 78 GRUPP, G., De POVER, A., GRUPP, I.L., SCHWARTZ, A.: Analysis of the inotropic action of ouabain in rat ventricles: two apparent ouabain inotropic responses. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 175, 39 - 43 (1984)
- 79 GRUPP, I., IM, W.-B., LEE, C.O., LEE, S.-W., PECKER, M.S., SCHWARTZ, A.: Relation of sodium pump inhibition to positive inotropy at low concentrations of ouabain in rat heart muscle. J. Physiol. 360, 149 - 160 (1985)
- 80 HALLE, W., JENTZSCH, K.D.: Aktuelle Probleme der Wirkstoffforschung. 6. Mitteilung: Zur Verwendung tierischer Zell- und Gewebekulturen für die Erfassung und Aufklärung biologischer Substanzwirkungen. Pharmakologische Untersuchungen an Herzzellen. Pharmazie 29, 433 - 442 (1974)
- 81 HANSEN, O.: Non-uniform populations of g-strophanthin binding sites of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase. Apparent conversion to uniformity by K^+ . Biochim. Biophys. Acta 433, 383 - 392 (1976)
- 82 HARARY, I., HOOVER, F., FARLEY, B.: The isolation and cultivation of rat heart cells. Methods Enzymol. 32, 740 - 745 (1974)
- 83 HARARY, I., RENAUD, J.-F., SATO, E., WALLACE, G.A.: Calcium ions regulate cyclic AMP and beating in cultured heart cells. Nature 261, 60 - 61 (1976)

- 84 HARARY, I., WALLACE, G., BRISTOL, G.: A video-computer for the chronotropic and inotropic measurements of the beating of cultured heart cells. *Cytometry* 3, 367 - 374 (1983)
- 85 HAUSTEIN, K.-O.: Therapeutic range of cardiac glycosides. *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 147 - 153 (1984)
- 86 HEALY, G.M., PARKER, R.C.: An improved chemically defined basal medium (CMRL-1415) for newly explanted mouse embryo cells. *J. Cell. Biol.* 30, 531 - 538 (1966)
- 87 HELLER, M.: Binding sites for ouabain in human and rat erythrocytes and in rat heart cells. *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 44 - 49 (1984)
- 88 HERZIG, S., MOHR, K.: Action of ouabain on rat heart: comparison with its effect on guinea-pig heart. *Br. J. Pharmacol.* 82, 135 - 142 (1984)
- 89 HOUGEN, T.J., SPICER, N., SMITH, T.W.: Stimulation of monovalent cation active transport by low concentrations of cardiac glycosides. *J. Clin. Invest.* 68, 1207 - 1214 (1981)
- 90 INAGAKI, C., LINDENMAYER, G.E., SCHWARTZ, A.: Effects of sodium and potassium on binding of ouabain to the transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 249, 5135 - 5140 (1974)
- 91 ISENBERG, G.: Contractility of isolated bovine ventricular myocytes is enhanced by intracellular injection of cardioactive glycosides. Evidence for an intracellular mode of action. *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 56 - 71 (1984)
- 92 JORGENSEN, P.: Mechanism of the Na^+ , K^+ pump. Protein structure and conformations of the pure $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. *Biochim. Biophys. Acta* 694, 27 - 68 (1982)
- 93 KASSEBAUM, D.: Electrophysiological effects of strophanthin in the heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 140, 329 - 334 (1963)
- 94 KAUFMANN, R., TRITTHART, H., RODENROTH, S., ROST, B.: Das mechanische und elektrische Verhalten isolierter embryonaler Herzmuskelzellen in Zellkulturen. *Pflügers Arch.* 311, 25 - 49 (1969)
- 95 KAUMANN, A.J., WITTMANN, R., BIRNBAUMER, L., HOPPE, B.H.: Activation of myocardial β -adrenoceptors by the nitrogen-free low affinity ligand 3',4'-dihydroxy- α -methylpropio-phenone (U-0521). *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 296, 217 - 228 (1977)

- 96 KAZAZOGLU, T., RENAUD, J.F., ROSSI, B., LAZDUNSKI, M.: Two classes of ouabain receptors in chick ventricular cardiac cells and their relation to (Na^+, K^+) -ATPase inhibition, intracellular Na^+ -accumulation, Ca^{2+} influx and cardiotonic effect. *J. Biol. Chem.* 258, 12163 - 12170 (1983)
- 97 KIM, D., BARRY, W.H., SMITH, T.W.: Kinetics of ouabain binding and changes in cellular sodium content, $^{42}K^+$ transport and contractile state during ouabain exposure in cultured chick heart cells. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 231, 326 - 333 (1984)
- 98 KIM, D., MARSH, J.P., BARRY, W.H., SMITH, T.W.: Effects of growth in low potassium medium or ouabain on membrane Na , K -ATPase, cation transport, and contractility in cultured chick heart cells. *Circ. Res.* 55, 39 - 48 (1984)
- 99 KLEIMAN, J.H., INGELS, N.B., DAUGHTERS, G., STINSON, E.B., ALDERMAN, E.L., GOLDMAN, R.H.: Left ventricular dynamics during longterm digoxin treatment in patients with stable coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 41, 937 - 942 (1978)
- 100 KOCHSIEK, K.: Increased therapeutic range, merely a pharmacokinetic problem? *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 154 - 160 (1984)
- 101 KOIDL, B., TRITTHART, H.A., ERKINGER, S.: Cultured embryonic chick heart cells: photometric measurement of the cell pulsation and the effects of calcium ions, electrical stimulation and temperature. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12, 165 - 178 (1980)
- 102 KOIDL, B., TRITTHART, H.A.: The effects of ouabain on the electrical and mechanical activities of embryonic chick heart cells in culture. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12, 663 - 673 (1980)
- 103 KOOMEN, J.M., VAN GILST, W.H., ZIMMERMAN, A.N.E., VAN NOORDWIJK, J.: A concentration-dependent biphasic positive inotropic action of ouabain on isolated hearts of rat and guinea-pig. *Arch. int. Pharmacodyn.* 255, 212 - 219 (1982)
- 104 KOOMEN, J.M., VAN GILST, W.H., SCHEVERS, J.A.M., WILTING, J.: Biphasic positive inotropic actions of ouabain on rat, guinea-pig and cat heart: a mathematical description. *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 102 - 109 (1984)
- 105 KUROBANE, I., NANDI, D.L., OKITA, G.T.: Difference of digitalis binding to Na , K -ATPase and sarcolemma membranes. *Curr. Top. Membr. Transp.* 19, 903 - 906 (1983)

- 106 LAMB, J.F., OGDEN, P.: Internalization of ouabain and replacement of sodium pumps in the plasma membranes of HeLa cells following block with cardiac glycosides. *Q. J. Exp. Physiol.* 67, 105 - 119 (1982)
- 107 LANGER, G.A., SERENA, S.D.: Effects of strophanthidin upon contraction and ionic exchange in rabbit ventricular myocardium: relation to control of active state. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1, 65 - 90 (1970)
- 108 LANGER, G.A., BRADY, A.J., TAN, S.T., SERENA, S.D.: Correlation of the glycoside response, the force staircase, and the action potential configuration in the neonatal rat heart. *Circ. Res.* 36, 744 - 752 (1975)
- 109 LANGER, G.A.: Relationship between myocardial contractility and the effects of digitalis on ionic exchange. *Fed. Proc.* 36, 2231 - 2234 (1977)
- 110 LANGER, G.: The role of calcium in the control of myocardial contractility: an update. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12, 231 - 239 (1980)
- 111 LANGER, G.A.: Mechanism of action of the cardiac glycosides on the heart. *Biochem. Pharmacol.* 30, 3261 - 3264 (1981)
- 112 LANGER, G.A.: The "sodium pump lag" revisited. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15, 647 - 651 (1983)
- 113 LAW, R.O.: Techniques and applications of extracellular space determination in mammalian tissues. *Experientia* 38, 411 - 420 (1982)
- 114 LAZDUNSKI, M., KAZAZOGLOU, T., RENAUD, J.F., ROSSI, B.: Digitalis receptors affinity labelling and relation with positive inotropic and cardiotoxic effects. *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 110 - 118 (1984)
- 115 LECHAT, P., MALLOY, C.R., SMITH, T.W.: Active transport and inotropic state in guinea pig left atrium. *Circ. Res.* 52, 411 - 422 (1983)
- 116 LEE, C.O., KANG, D.H., SOKOL, J.H., LEE, K.S.: Relation between intracellular Na-ion activity and tension of sheep cardiac purkinje fibers exposed to dihydro-ouabain. *Biophys. J.* 29, 315 - 330 (1980)
- 117 LEE, C.O., DAGOSTINO, M.: Effect of strophanthidin on intracellular Na-ion activity and twitch tension of constantly driven canine cardiac purkinje fibers. *Biophys. J.* 40, 185 - 198 (1982)

- 118 LEE, D.C.-S., JOHNSON, R.A., BINGHAM, J.B., LEAHY, M., DINSMORE, R.E., GOROLL, A.H., NEWELL, J.B., STRAUSS, H.W., HABER, E.: Heart failure in outpatients. A randomized trial of digoxin versus placebo. *N. Engl. J. Med.* 306, 699 - 705 (1982)
- 119 LEE, K.S., KLAUS, W.: The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. *Pharmacol. Rev.* 23, 193 - 261 (1971)
- 120 LELIEVRE, L.G., MANSIER, P., CHARLEMAGNE, D., SWYNGHE-DAUW, B.: Effects of calcium on the heterogeneity of the Na^+ , K^+ -ATPase forms in rat heart. *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 128 - 133 (1984)
- 121 LIEBERMAN, M.: Persönliche Mitteilung
- 122 LIMBIRD, L.E., DE MEYTS, P., LEFKOWITZ, R.J.: β -adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 1160 - 1168 (1975)
- 123 LIMBIRD, L.E., LEFKOWITZ, R.J.: Negative cooperativity among β -adrenergic receptors in frog erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 251, 5007 - 5014 (1976)
- 124 LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275 (1951)
- 125 LÜLLMANN, H., PETERS, T.: Action of cardiac glycosides on the excitation-contraction coupling in heart muscle. *Prog. Pharmacol.* 2, 3 - 57 (1979)
- 126 LÜLLMANN, H., PETERS, T.: Influence of cardiac glycosides on cell membrane. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 56/I, Cardiac Glycosides, Herausgeber: K. Greeff; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 395 - 406 (1981)
- 127 MANSIER, P., LELIEVRE, L.G.: Ca^{2+} -free perfusion of rat heart reveals a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase form highly sensitive to ouabain. *Nature* 300, 535 - 537 (1982)
- 128 MANSIER, P., CASSIDY, P.S., CHARLEMAGNE, D., PRETESEILLE, M., LELIEVRE, L.G.: Three Na^+ , K^+ -ATPase forms in rat heart as revealed by K^+ /ouabain antagonism. *FEBS Letters* 153, 357 - 360 (1983)
- 129 MARTINEZ, T.T., WALKER, M.J.A.: The actions of ouabain, dinitrophenol, anoxia and ionic manipulation on cultured heart cells. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 20, 269 - 273 (1977)

- 130 MARVIN, W.J., ROBINSON, R.B., HERMSMEYER, K.: Correlation of function and morphology of neonatal rat and embryonic chick cultured cardiac and vascular muscle cells. *Circ. Res.* 45, 528 - 540 (1979)
- 131 MASON, D.T.: Afterload reduction and cardiac performance. *Am. J. Med.* 65, 106 - 125 (1978)
- 132 MATSUI, H., SCHWARTZ, A.: Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the $(Na^+ + K^+)$ -dependent ATPase from cardiac tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 151, 655 - 663 (1968)
- 133 McCall, D.: Cation exchange and glycoside binding in cultured rat heart cells. *Am. J. Physiol.* 236, C87 - C95 (1979)
- 134 McCUBBIN, W.D., KAY, C.M.: Calcium induced conformational changes in the troponin-tropomyosin complexes of skeletal and cardiac muscle and their roles in the regulation of contraction-relaxation. *Acc. Chem. Res.* 13, 185 - 192 (1980)
- 135 MELDGAARD, L., STEINESS, E., WALDORFF, S.: Time course of ouabain uptake in isolated myocardial cells: dependence on extracellular potassium and calcium concentrations. *Br. J. Pharmacol.* 73, 341 - 345 (1981)
- 136 MICHAEL, L., PITTS, B.J., SCHWARTZ, A.: Is pump stimulation associated with positive inotropy of the heart? *Science* 200, 1287 - 1289 (1978)
- 137 MURTHY, R.V., KIDWAI, A.M., DANIEL, E.E.: Dissociation of contractile effect and binding and inhibition of $Na^+ - K^+$ - adenosine triphosphatase by cardiac glycosides in rabbit myometrium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 188, 575 - 581 (1974)
- 138 MYERS, T.D., FRASER, J.P., BOERTH, R.C.: Binding of 3H -ouabain by isolated cardiac myocytes. *Fed. Proc.* 37, 913 (1978)
- 139 NOACK, E.: Cardiac glycosides and intracellular Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 87 - 92 (1984)
- 140 NOBLE, D.: Mechanism of action of therapeutic levels of cardiac glycosides. *Cardiovasc. Res.* 14, 495 - 514 (1980)
- 141 NOEL, F., GODFRAIND, T.: Heterogeneity of ouabain specific binding sites and $(Na^+ + K^+)$ -ATPase inhibition in microsomes from rat heart. *Biochem. Pharmacol.* 33, 47 - 53 (1984)
- 142 NOLA, G.T., POPE, S., HARRISON, D.C.: Assessment of the synergistic relationship between serum calcium and digitalis. *Am. Heart J.* 79, 499 - 507 (1970)

- 143 OKARMA, T.B., TRAMELL, P., KALMAN, S.M.: The surface interaction between digoxin and cultured heart cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 183, 559 - 576 (1972)
- 144 OKITA, G.T., RICHARDSON, F., ROTH-SCHECHTER, B.: Dissociation of the positive inotropic action of digitalis from inhibition of sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185, 1 - 11 (1973)
- 145 OKITA, G.T.: Dissociation of Na^+ , K^+ -ATPase inhibition from digitalis inotropy. *Fed. Proc.* 36, 2225 - 2230 (1977)
- 146 ONJI, T., LIU, M.S.: Ouabain receptor in isolated adult dog heart myocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 207, 148 - 156 (1981)
- 147 PETERS, T., RABEN, R.H., WASSERMANN, O.: Evidence for a dissociation between positive inotropic effect and inhibition of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase by ouabain, cassaine and their alkylating derivatives. *Europ. J. Pharmacol.* 26, 166 - 174 (1974)
- 148 PETERSON, G.L., CHURCHILL, L., FISHER, J.A., HOKIN, L.E.: Structure and biosynthesis of (Na, K) -ATPase in developing brine shrimp nauplii. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 402, 185 - 205 (1982)
- 149 PHILIPP, G.: Spezifische Herzglykosidrezeptoren. Bindungsstudien mit $[\text{}^3\text{H}]$ -g-Strophanthin an verschiedenen Organen und Zellmembranen der Ratte und des Meerschweinchens. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München (1980)
- 150 PHILIPSON, K.D., NISHIMOTO, A.Y.: Na^+ - Ca^{2+} exchange is affected by membrane potential in cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.* 255, 6880 - 6882 (1980)
- 151 POLLACK, L.R., TATE, E.H., COOK, J.S.: Turnover and regulation of Na - K -ATPase in HeLa cells. *Am. J. Physiol.* 241, C173 - C183 (1981)
- 152 PRYZBYLA, A.C., PAULAY, K.S., STEIN, W., DAMATO, A.N.: Effects of digoxin on atrioventricular conduction patterns in man. *Am. J. Cardiol.* 33, 344 - 350 (1974)
- 153 REEVES, J.P., SUTKO, J.L.: Sodium-calcium ion exchange in cardiac membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 590 - 594 (1979)
- 154 REEVES, J.P., SUTKO, J.L.: Sodium-calcium exchange activity generates a current in cardiac membrane vesicles. *Science* 208, 1461 - 1464 (1980)

- 155 REPKE, K., PORTIUS, H.J.: Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym. *Experientia* 19, 452 - 458 (1963)
- 156 REPKE, K.: Über den biochemischen Wirkungsmodus von Digitalis. *Klin. Wochenschr.* 42, 157 - 165 (1964)
- 157 REPKE, K., EST, M., PORTIUS, H.J.: Über die Ursache der Speziesunterschiede in der Digitalisempfindlichkeit. *Biochem. Pharmacol.* 14, 1785 - 1802 (1965)
- 158 REPKE, K.R.H., SCHÖNFELD, W.: Na^+/K^+ ATPase as the digitalis receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 5, 393 - 397 (1984)
- 159 RESH, M.D., NEMENOFF, R.A., GUIDOTTI, G.: Insulin stimulation of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -adenosine triphosphatase-dependent $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 255, 10938 - 10945 (1980)
- 160 REUTER, H., SEITZ, N.: The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J. Physiol. (Lond.)* 195, 451 - 470 (1968)
- 161 REUTER, H.: Exchange of calcium in mammalian myocardium. Mechanism and physiological significance. *Circ. Res.* 34, 599 - 605 (1974)
- 162 ROSEN, M.R., WIT, A.L., HOFFMAN, B.F.: Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias. IV. Cardiac antiarrhythmic and toxic effects of digitalis. *Am. Heart J.* 89, 391 - 399 (1975)
- 163 SCATCHARD, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660 - 672 (1949)
- 164 SCHANNE, O.F., BKAILY, G.: Explanted cardiac cells: a model to study drug actions? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59, 443 - 467 (1981)
- 165 SCHATZMANN, H.-J.: Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran. *Helv. Physiol. Acta* 11, 346 - 354 (1953)
- 166 SCHONER, W., v. ILBERG, C., KRAMER, R., SEUBERT, W.: On the mechanism of Na^+ - and K^+ -stimulated hydrolysis of adenosine triphosphatase. 1. Purification and properties of a Na^+ - K^+ -activated ATPase from ox brain. *Europ. J. Biochem.* 1, 334 - 343 (1967)
- 167 SCHROEDL, N.A., HARTZELL, C.R.: Myocytes and fibroblasts exhibit functional synergism in mixed cultures of neonatal rat heart cells. *J. Cell. Physiol.* 117, 326 - 332 (1983)

- 168 SCHUURMANS STEKHOVEN, F., BONTING, S.L.: Transport adenosine triphosphatases: properties and functions. *Physiol. Rev.* 61, 1 - 76 (1981)
- 169 SCHWALB, H., DICKSTEIN, Y., HELLER, M.: Interaction of cardiac glycosides with cardiac cells. III. Alterations in the sensitivity of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase to inhibition by ouabain in rat hearts. *Biochim. Biophys. Acta* 689, 241 - 248 (1982)
- 170 SCHWARTZ, A., LINDENMAYER, G.E., ALLEN, J.C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* 27, 3 - 134 (1975)
- 171 SCHWENK, M., WIEDMANN, T., REMMER, H.: Uptake, accumulation and release of ouabain by isolated rat hepatocytes. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 316, 340 - 344 (1981)
- 172 SEEMAN, P.: Nomenclature of central and peripheral dopaminergic sites and receptors. *Biochem. Pharmacol.* 31, 2563 - 2568 (1982)
- 173 SKOU, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 349 - 401 (1957)
- 174 SKOU, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membranes. *Physiol. Rev.* 45, 596 - 617 (1965)
- 175 SMITH, T.W., KIM, D., BARRY, W.H.: Studies of the inotropic mechanisms of cardiac glycosides in cultured heart cells. *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 140 - 146 (1984)
- 176 SODERBERG, K., ROSSI, B., LAZDUNSKI, M., LOUVARD, D.: Characterization of ouabain-resistant mutants of a canine kidney cell line, MDCK. *J. Biol. Chem.* 258, 12300 - 12307 (1983)
- 177 SWEADNER, K.J.: Two molecular forms of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -stimulated ATPase in brain. *J. Biol. Chem.* 254, 6060 - 6067 (1979)
- 178 TANIGUCHI, K., IIDA, S.: Two apparently different ouabain binding sites of $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 288, 98 - 102 (1972)
- 179 TEN EICK, R.E., BASSETT, A.L., OKITA, G.T.: Dissociation of electrophysiological and inotropic actions of strophanthidin-3-bromoacetate: possible role of adenosine triphosphatase in the maintenance of the myocardial transmembrane Na^+ and K^+ gradients. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185, 12 - 23 (1973)

- 180 WALLICK, E.T., LANE, L.K., SCHWARTZ, A.: Biochemical mechanism of the sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.* 41, 397 - 411 (1979)
- 181 WARBANOW, W.: Die mechanische Aktivität kultivierter Herzzellen. Physiologische und pharmakologische Untersuchungen. Dissertation zur Promotion B und Erlangung des akad. Grades Dr. sc. med.; Berlin-Buch 1980
- 182 WASSERSTROM, J.A., SCHWARTZ, D.J., FOZZARD, H.A.: Relation between intracellular sodium and twitch tension in sheep cardiac purkinje strands exposed to cardiac glycosides. *Circ. Res.* 52, 697 - 705 (1983)
- 183 WEIDEMANN, M.J., ERDELT, H., KLINGENBERG, M.: Adenine nucleotide translocation of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 16, 313 - 335 (1970)
- 184 WELLSMITH, N.V., LINDENMAYER, G.E.: Two receptor forms for ouabain in sarcolemma-enriched preparations from canine ventricle. *Circ. Res.* 47, 710 - 720 (1980)
- 185 WERDAN, K., BAURIEDEL, G., BOZSIK, M., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Effects of vanadate in cultured rat heart muscle cells. Vanadate transport, intracellular binding and vanadate-induced changes in beating and in active cation flux. *Biochim. Biophys. Acta* 597, 364 - 383 (1980)
- 186 WERDAN, K., BAURIEDEL, G., FISCHER, B., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H.: Stimulatory (insulin-mimetic) and inhibitory (ouabain-like) action of vanadate on potassium uptake and cellular sodium and potassium in heart cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 687, 79 - 93 (1982)
- 187 WERDAN, K., ZWISSLER, B., WAGENKNECHT, B., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Quantitative correlation of cardiac glycoside binding to its receptor and inhibition of the sodium pump in chicken heart cells in culture. *Biochem. Pharmacol.* 32, 757 - 760 (1983)
- 188 WERDAN, K., WAGENKNECHT, B., ZWISSLER, B., BROWN, L., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Cardiac glycoside receptors in cultured heart cells - I. Characterization of one single class of high affinity receptors in heart muscle cells from chick embryos. *Biochem. Pharmacol.* 33, 55 - 70 (1984)
- 189 WERDAN, K., SCHNEIDER, G., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Chronic exposure to low K^+ increases cardiac glycoside receptors in cultured cardiac cells: different responses of cardiac muscle and non muscle cells from chicken embryos. *Biochem. Pharmacol.* 33, 1161 - 1164 (1984)

- 190 WERDAN, K., WAGENKNECHT, B., ZWISSLER, B., BROWN, L., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Cardiac glycoside receptors in cultured heart cells - II. Characterization of a high affinity and a low affinity binding site in heart muscle cells from neonatal rats. *Biochem. Pharmacol.* 33, 1873 - 1886 (1984)
- 191 WERDAN, K., REITHMANN, C., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Chronic exposure to toxic but not to "therapeutic" concentrations of ouabain increases cardiac glycoside receptors in cardiac muscle cells from chicken embryos. *Biochem. Pharmacol.* 33, 2337 - 2340 (1984)
- 192 WERDAN, K., ZWISSLER, B., WAGENKNECHT, B., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Cardiac glycoside binding sites in cultured heart muscle cells. *Basic Res. Cardiol.* 79 (Suppl.), 35 - 43 (1984)
- 193 WERDAN, K.: Herzglykosid-Rezeptoren der intakten Herzmuskelzelle - Eigenschaften und deren experimentelle Beeinflussung. Habilitationsschrift zur Erlangung des Grades eines habilitierten Doktors der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (1984)
- 194 WILL, P.C., LONGWORTH, J.W., BRAKE, E.T., COOK, J.S.: Analysis of intracellular drug (ouabain) sequestration as a mechanism of detoxification. *Mol. Pharmacol.* 13, 161 - 171 (1977)
- 195 WITHERING, W.: An account of the foxglove, and some of its medical uses: with practical remarks on dropsy, and other diseases. Birmingham, England: Printed by M. Swinney for G.G.J. and J. Robinson, 1785
- 196 WOLLENBERGER, A.: Rhythmic and arrhythmic contractile activity of single myocardial cells cultured in vitro. *Circ. Res.* 14/15 (Suppl. II), 184 - 201 (1964)
- 197 ZWISSLER, B.: Der Herzglykosid-Rezeptor kontrahierender Hühnerherz-Muskelzellen in Kultur. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München (1985)

Während dieser Zeit sind in Wiesbaden und Umgebung
h. Tausende der hier eingekerkerten Menschen, welche
nicht in d. Sinne der neuen H. (d. h. der neuen
Führung der Staatsverwaltung) zu Machtergreifung
sind, aus dem Lande vertrieben.

Wäre nicht diese Zeit nicht hätte in Wiesbaden
der Herr Reichsminister Dr. K. Müller, welcher
nicht persönlich Dr. K. Müller für die Zeit
... in der ...
... und ...
... und ...
... und ...

LEBENS LAUF

Am 21. September 1959 wurde ich in Stuttgart-Bad Cannstatt als erstes Kind des Studiendirektors Bruno Wagenknecht und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Spanier geboren.

- | | |
|-------------|---|
| 1966 - 1967 | Volksschule in Stuttgart-Möhringen |
| 1967 - 1969 | Volksschule an der Fürstenrieder Straße, München |
| 1969 - 1978 | Max-Planck-Gymnasium, München-Pasing |
| 1978 | Abitur |
| | |
| 1978 - 1985 | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 1981 - 1984 | Doktorarbeit an der Medizinischen Klinik I der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern |
| | |
| 1984 - 1985 | Im Rahmen des Praktischen Jahres Ausbildung an der Medizinischen Klinik I und der Frauenklinik im Klinikum München-Großhadern sowie der Chirurgischen Klinik Innenstadt und der Klinik für Kieferchirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| | |
| Sommer 1985 | 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation |

Seit September 1985 arbeite ich als Research Associate am Department of Physiology (Labor Professor Melvyn Lieberman), Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA.

